

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Klaus Frieese

# **Die Bedeutung des Retinoid-X-Rezeptors $\alpha$ und des Leptin Rezeptors für apoptotische Prozesse in Abortplazenten**

DISSERTATION  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
**Aurelia Sabeth Pestka**  
aus  
Düsseldorf  
2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. rer. nat. Udo Jeschke
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. Doris Mayr Priv. Doz. Dr. Dejana Mokranjac
Mitbetreuung durch die habilitierte Mitarbeiterin:	Prof. Dr. med. Bettina Toth
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	18.04.2013

**FÜR MEINE ELTERN**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Pathogenese des Abortgeschehens</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Die Nukleäre Rezeptoren Superfamilie</b>	<b>2</b>
1.2.1	Evolution der nukleären Rezeptoren	2
1.2.2	Einteilung und Funktion der nukleären Rezeptoren	2
<b>1.3</b>	<b>Schlüsselrezeptor für metabolische Signalwege: der Retinoid-X-Rezeptor</b>	<b>6</b>
1.3.1	Vorkommen und Funktionen des Retinoid-X-Rezeptors	6
<b>1.4</b>	<b>Aktivatoren von RXR und RAR: die Retinoide</b>	<b>8</b>
1.4.1	Pharmakologischer Einsatz und Nebenwirkungen von Retinoiden	10
<b>1.5</b>	<b>Aktivatoren von PPAR: die Prostaglandine</b>	<b>10</b>
<b>1.6</b>	<b>Der Leptin Rezeptor und sein Ligand Leptin</b>	<b>11</b>
1.6.1	Interaktion zwischen Leptin und den nukleären Rezeptoren RXR $\alpha$ und PPAR $\gamma$	11
1.6.2	Isoformen und Signaltransduktion des Leptin Rezeptors	12
1.6.3	Funktionen von Leptin	13
<b>1.7</b>	<b>Expression des Retinoid-X-Rezeptors <math>\alpha</math>, des Leptin Rezeptors und Leptins in Abortplazenten</b>	<b>14</b>
<b>1.8</b>	<b>Molenschwangerschaft</b>	<b>15</b>
<b>1.9</b>	<b>Expression des Retinoid-X-Rezeptors <math>\alpha</math>, des Leptin Rezeptors und Leptins in der Blasenmole</b>	<b>15</b>
<b>1.10</b>	<b>Trophoblastzellen</b>	<b>16</b>
1.10.1	Genese der Trophoblastzellen	16
1.10.2	Trophoblastzellen-Modell: BeWo und JEG-3	17
1.10.3	Bedeutung der Apoptose in der Schwangerschaft	18
<b>1.11</b>	<b>Zentrale Problemstellung und Zielsetzung</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>20</b>
<b>2.1</b>	<b>Geräte und Verbrauchsmaterialien</b>	<b>20</b>
<b>2.2</b>	<b>Chemikalien</b>	<b>22</b>
<b>2.3</b>	<b>Lösungen</b>	<b>22</b>
<b>2.4</b>	<b>Substanzen</b>	<b>22</b>

<b>2.5 Antikörper</b>	<b>23</b>
2.5.1 Immunzytochemie	23
2.5.2 Western Blot	23
2.5.3 Dotblot	23
2.5.4 Doppelimmunfluoreszenz	23
<b>2.6 Zellen</b>	<b>24</b>
<b>2.7 Gewebe</b>	<b>24</b>
<b>2.8 Software</b>	<b>24</b>
<b>2.9 Reagenzien, Lösungen und Zubehör für dedizierte Versuche</b>	<b>25</b>
2.9.1 Immunzytochemie	25
2.9.2 Gelelektrophorese für Western Blot	25
2.9.3 RNA-Extraktion, Reverse Transkription, Quantitative Real-time PCR	26
2.9.4 Primer	26
2.9.5 Bradford Assay	27
2.9.6 Dotblot und Western Blot	27
2.9.7 Doppelimmunfluoreszenz	28
<b>3 METHODEN</b>	<b>29</b>
<b>3.1 Zellkultur</b>	<b>29</b>
3.1.1 Voraussetzungen	29
3.1.2 Zellkultivierung von BeWo und JEG-3 Zellen	29
3.1.3 Zellkultivierung von HVT-Zellen	30
3.1.4 Einfrieren von Zellen	30
3.1.5 Aussaat von eingefrorenen Zellen	30
3.1.6 Bestimmung der Zellzahl	31
<b>3.2 Detektion der Rezeptoren RXR<math>\alpha</math> und ObR auf Proteinebene</b>	<b>31</b>
3.2.1 Immunzytochemie zum Nachweis von RXR $\alpha$ und ObR	31
3.2.2 Dot Blot zum Nachweis von ObR	35
3.2.3 Western Blot zum Nachweis von RXR $\alpha$	39
<b>3.3 Detektion der Rezeptoren RXR<math>\alpha</math> und ObR auf mRNA-Ebene</b>	<b>41</b>
3.3.1 Prinzip der quantitativen Real-time PCR (TaqMan <sup>®</sup> -PCR)	41
3.3.2 Stimulation von BeWo und JEG-3 Zellen	41
3.3.3 RNA Extraktion	42
3.3.4 Reverse Transkription	43
3.3.5 Quantitative Real-time PCR (TaqMan <sup>®</sup> -PCR)	43

3.3.6	Auswertung der Real-time PCR (TaqMan®-PCR)	45
<b>3.4</b>	<b>Statistische Auswertung der Immunzytochemie, des Dot Blots, des Western Blots und der TaqMan®-PCR</b>	<b>45</b>
<b>3.5</b>	<b>Doppelimmunfluoreszenz</b>	<b>45</b>
3.5.1	Auswertung der Doppelimmunfluoreszenzfärbung	48
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>49</b>
<b>4.1</b>	<b>Regulation der RXR<math>\alpha</math> Protein- und mRNA-Expression</b>	<b>49</b>
4.1.1	RXR $\alpha$ – Immunzytochemie	49
4.1.2	RXR $\alpha$ – Western Blot von BeWo und JEG-3 Zellen	63
4.1.3	RXR $\alpha$ – Quantitative Real-time Polymerase-Kettenreaktion (TaqMan®-PCR)	64
<b>4.2</b>	<b>Regulation der Leptin Rezeptor Expression in BeWo und JEG-3 Zellen</b>	<b>67</b>
4.2.1	Leptin Rezeptor – Immunzytochemie	67
4.2.2	Leptin Rezeptor – Dot Blot	70
4.2.3	Leptin Rezeptor – Real-time Polymerase-Kettenreaktion (TaqMan®-PCR)	73
<b>4.3</b>	<b>Doppelimmunfluoreszenz</b>	<b>74</b>
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>77</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>86</b>
<b>7</b>	<b>ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE</b>	<b>87</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>91</b>
<b>9</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>101</b>
<b>10</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>104</b>
<b>11</b>	<b>VERÖFFENTLICHUNGEN UND KONGRESSBEITRÄGE</b>	<b>105</b>
<b>12</b>	<b>CURRICULUM VITAE</b>	<b>107</b>
<b>13</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>108</b>
<b>14</b>	<b>EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG</b>	<b>109</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Pathogenese des Abortgeschehens

Spontane Aborte betreffen etwa 25-50% der Frauen im reproduktionsfähigem Alter [1]. Sie sind definiert durch ein „vorzeitiges Ende einer Schwangerschaft mit einem Fetus ohne Lebenszeichen und einem Gewicht unter 500g“ [2]. Aborte stellen die häufigste Schwangerschaftskomplikation dar [1]. Bis zur 13. Schwangerschaftswoche (SSW) post menstruationem (p.m.) wird der Abort als Frühabort bezeichnet und von der 14. p.m. bis zu der 22. SSW p.m. handelt es sich um einen Spätabort [3]. Ein totgeborener Fetus mit einem Gewicht über 500g und ohne Lebenszeichen ab der 23. SSW wird als Totgeburt bezeichnet [3]. Die Ursachen für Aborte sind vielseitig. Bei Frühaborten handelt es sich meistens um embryonale Ursachen, v.a. Chromosomenanomalien (Trisomien, Monosomien, Polyploidien etc.), die mit steigendem Alter der Schwangeren häufiger werden [1]. Mütterliche Ursachen, die meist Spätaborte hervorrufen, sind z.B. Uterusmyome, kongenitale Fehlbildungen wie Uterus bicornis, Zervixinsuffizienz nach Konisation und Verwachsungen im Cavum uteri nach Kürettagen. Plazentainsuffizienz, Plazenta praevia, mangelnde Schwangerschaftshormonproduktion durch eine Corpus-luteum-Insuffizienz, Gerinnungsstörungen wie das Antiphospholipid-Syndrom und Blutgruppeninkompatibilitäten wie der Morbus haemolyticus fetalis können ebenfalls zu Aborten führen [2]. Häufig sind die Ursachen von Aborten jedoch nicht bekannt [4].

Abhängig von der klinischen Situation werden Aborte folgendermaßen unterteilt:

- drohender Abort (Abortus imminens)
- beginnender Abort (Abortus incipiens)
- unvollständiger Abort (Abortus incompletus)
- vollständiger Abort (Abortus completus)
- verhaltener Abort (missed Abortion)
- febriler bis septischer Abort (Abortus febrilis)

Die World Health Organization (WHO) definiert den rezidivierenden Abort (Abortus habitualis) als drei konsekutiv auftretende Aborte vor Ende der 20. SSW [5]. Die Wiederholungswahrscheinlichkeit liegt hier bei etwa 40% bis 80% [1]. Beim Schwangerschaftsabbruch, der sog. Interruptio bzw. Abruptio graviditatis, wird die Schwangerschaft vorzeitig beendet [2]. Bis zur 14. SSW erfolgt die Interruptio mit präoperativer Prostglandingabe und anschließender Kürettage [3]. Nach § 218/219 des Strafgesetzbuches ist die Abruptio bis zur 12. Woche p.c. nach einer vorherigen Beratung durch den Arzt und mindestens dreitägiger Bedenkzeit für die Patientin nicht strafbar [3].

Aborte führen zu einem hohen Leidensdruck der Schwangeren und deren Familien. In einer Studie von Gold *et al.* (2010) wurde der Einfluss der Schwangerschaftserfolge (regelrechte Geburt/Abort/Totgeburt) auf die Beendigung der Ehe/Partnerschaft der Schwangeren angezeigt [6]. Es stellte sich heraus, dass sich Ehen/Partnerschaften nach einem Abort im Vergleich zu Ehen/Partnerschaften in der Gesamtbevölkerung mit regelrechten Geburten häufiger nach 1½ bis 3 Jahren auflösen. Die seelische Belastung der Patientinnen und ihrer Partner, die hohe Inzidenz von Aborten in der Gesamtbevölkerung und die Vielzahl an ungeklärten Aborten verdeutlichen den Forschungsbedarf auf diesem Gebiet.

## **1.2 Die Nukleäre Rezeptoren Superfamilie**

### **1.2.1 Evolution der nukleären Rezeptoren**

Steroidale und nicht-steroidale nukleäre Rezeptoren gehören beide zu der Superfamilie der nukleären Rezeptoren. Im Gegensatz zu den steroidalen Rezeptoren, die Organe und enzymatische Prozesse für die Synthese ihrer hormonellen Liganden benötigen [7], beziehen die nicht-steroidalen Rezeptoren, wie z.B. RXR und VDR, ihre Liganden aus der Pflanzenwelt. Quallen und Meeres-Anemonen waren die ersten Metazoen, in denen nukleäre Rezeptoren exprimiert wurden [8]. Die Superfamilie der nukleären Rezeptoren stammt vermutlich von einem einzelnen Vorfahren ab, der durch DNA-Bindung zur Transkription beiträgt [9]. Aus diesem Vorfahren haben sich wahrscheinlich die Subfamilie II, die den RXR beinhaltet, und die Subfamilie V entwickelt [10]. Durch zwei darauffolgende Duplikationsprozesse entstanden die anderen nukleären Rezeptoren, u.a. auch die Subfamilie III, zu denen die steroidalen Rezeptoren gehören [10]. Diese kommen nur in Vertebraten vor und sind evolutionsphysiologisch die neueste Gruppe der Superfamilie [10]. Aufgrund der komplexen Funktion von RXR und seiner Fähigkeit, mit anderen nukleären Rezeptoren zu interagieren, vermuten Ahuja *et al.* (2003), dass sich die nukleären Rezeptoren als Verfeinerung aus RXR entwickelt haben [10].

### **1.2.2 Einteilung und Funktion der nukleären Rezeptoren**

2004 haben die drei Wissenschaftler Pierre Chambon, Ronald M. Evans und Elwood V. Jensen den „Albert Lasker Award for Basic Medical Research“, der auch unter dem Synonym „Amerikas Nobelpreis“ bekannt ist, für ihre Entdeckung und Analyse der Superfamilie der Nukleären Rezeptoren erhalten [11]. Die nukleären Rezeptoren wurden in der Pressemitteilung der Albert Lasker Award Preisverleihung am 26. September 2004 folgendermaßen beschrieben: „Sie beeinflussen jedes Entwicklungs- und metabolische Ereignis in Menschen und Tieren. Die Konsequenzen, die aus dieser



Forschung gezogen werden können, um Krankheiten zu verstehen und die Entwicklung von Medikamenten voranzutreiben, sind tiefgründig und vielversprechend für die Zukunft“ [11]. Chambon, Evans und Jensen haben durch ihre Entdeckung und Analyse der nukleären Rezeptoren einen Grundstein für die Erforschung physiologischer und pathologischer Signaltransduktionswege gelegt.

Im Jahr 1991 identifizierte Evans einen Rezeptor, der sowohl in Fruchtfliegen wie in Säugetieren aktiv war. Er entdeckte, dass dieser Rezeptor auf Retinsäure reagiert und nannte ihn Retinoid-X-Rezeptor (RXR) [12]. Chambon führte parallel Versuche mit den nukleären Rezeptoren Retinoid-A-Rezeptor, Thyroidhormon-Rezeptor und Vitamin-D-Rezeptor durch und erkannte, dass diese Rezeptoren am besten an die Ziel-DNA binden, wenn sich Zellmaterial in den Reagenzgläsern befindet. Chambon vermutete, dass das Zellmaterial eine bestimmte Substanz beinhaltet, die zur Aktivierung der Rezeptoren beiträgt. Nach Aufbereitung des Zellmaterials entdeckte er als wesentlichen Bestandteil den Retinoid-X-Rezeptor [13-15]. RXR kann Heterodimere mit anderen nukleären Rezeptoren formen und dadurch deren Transkription aktivieren [16, 17]. Zusätzlich kann RXR als Homodimer fungieren [18].

Der Entdeckung von RXR folgte die Identifizierung weiterer nukleärer Rezeptoren durch Chambon, Evans und Jensen. Die Wissenschaftler stellten fest, dass die Signalwege von Retinoiden mit denen von Steroidhormonen, Schilddrüsenhormonen, Vitamin D, Fettsäuren und Gallensäuren interagieren und sich gegenseitig beeinflussen. Da RXR ein obligater DNA-Bindungspartner für andere nukleäre Rezeptoren ist, leistet RXR einen entscheidenden Beitrag bei metabolischen und endokrinologischen Signalwegen [16].

Bisher sind 48 nukleäre Rezeptoren bekannt, deren Liganden aber noch nicht komplett identifiziert sind [19]. Rezeptoren, deren Liganden noch unentdeckt sind, werden als Waisen-Rezeptoren bzw. Orphan Receptors bezeichnet [20]. Nach der Phylogenese werden die nukleären Rezeptoren in sechs Untergruppen unterteilt [10] (Tabelle 1): Die Subfamilie I beinhaltet die Rezeptoren, die mit RXR Heterodimere bilden können. Dazu gehören der Thyroidhormonrezeptor ( $TR\alpha$ ,  $\beta$ ), der Retinsäure-A-Rezeptor ( $RAR\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), der Peroxisomen-Proliferator-aktivierte-Rezeptor ( $PPAR\alpha$ ,  $\beta/\delta$ ,  $\gamma$ ) und der Vitamin-D-Rezeptor (VDR). Zudem gehören der Farnesoid-X-Rezeptor (FXR), Leber-X-Rezeptor ( $LXR\alpha$ ,  $\beta$ ), Pregnane-X-Rezeptor (PXR), der Constitutive Androstane Receptor (CAR) und der RAR-verwandte Waisen-Rezeptor ( $ROR\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) zur Subfamilie I [21-23]. Die Mitglieder der Subfamilie III, wozu die Steroidhormon Rezeptoren wie der Östrogen Rezeptor (ER), Androgen Rezeptor (AR), Progesteron Rezeptor (PR), Mineralkortikoid Rezeptor (MR) und der Glukokortikoidrezeptor (GR) gezählt werden, bilden hauptsächlich Homodimere [24]. Der Retinoid-X-Rezeptor (RXR) und der Hepatozyten Nukleäre Faktor 4 ( $HNF-4\alpha$ ,  $\gamma$ ) werden beim Menschen der Subfamilie II zugeteilt [24]. Zur Subfamilie IV gehören der Neuronen-abgeleitete

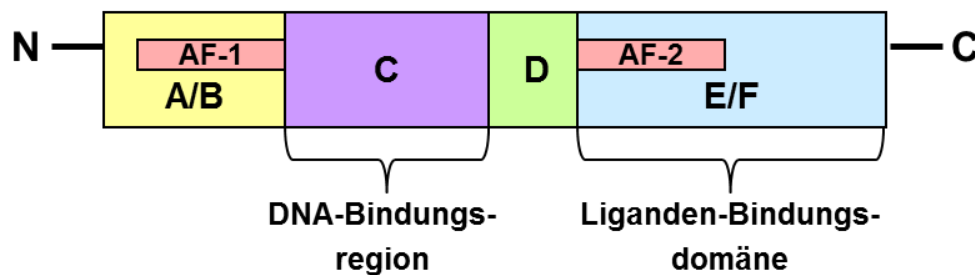
Orphan Rezeptor 1 (Nor-I), der Nuclear Receptor Related 1 (Nurr1) und der Nerve Growth Factor IB (NGFI-B) [10]. Die Subfamilie V beinhaltet den FTZ Transcription Factor 1 (FTZ-F1) aus der Drosophila und den Steroidogenic Factor-1 (SF-1), der in Säugetieren vorkommt [10]. Der Germ Cell Nuclear Factor (GCNF) gehört zur Subfamilie VI [10].

Superfamilie	Nukleäre Rezeptoren	
<b>S I</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ TR<math>\alpha</math>, <math>\beta</math></li> <li>▪ RAR<math>\alpha</math>, <math>\beta</math>, <math>\gamma</math></li> <li>▪ PPAR<math>\alpha</math>, <math>\beta/\delta</math>, <math>\gamma</math></li> <li>▪ VDR</li> <li>▪ FXR</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ LXR<math>\alpha</math>, <math>\beta</math></li> <li>▪ PXR</li> <li>▪ CAR</li> <li>▪ ROR<math>\alpha</math>, <math>\beta</math>, <math>\gamma</math></li> </ul>
<b>S II</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ RXR<math>\alpha</math>, <math>\beta/\delta</math>, <math>\gamma</math></li> <li>▪ HNF-4<math>\alpha</math>, <math>\gamma</math></li> </ul>	
<b>S III</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ ER</li> <li>▪ AR</li> <li>▪ PR</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ MR</li> <li>▪ GR</li> </ul>
<b>S IV</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Nor-I</li> <li>▪ Nurr1</li> </ul>	
<b>S V</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ FTZ-F1</li> <li>▪ SF-1</li> </ul>	
<b>S VI</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ GCNF</li> </ul>	

**Tabelle 1: Nukleäre Rezeptoren Superfamilien I-VI**

Nukleäre Rezeptoren bestehen aus verschiedenen funktionellen Domänen, die die Transkription regulieren. Der funktionelle Aufbau eines nukleären Rezeptors ist in Abbildung 1 dargestellt: Die hypervariable N-terminale A/B-Domäne kann unabhängig von Liganden agieren und beinhaltet die variable Amino terminale transkriptionale Aktivierungsregion (AF-1) [10]. Die DNA-Bindungsregion (DNA binding domain, DBD), die aus zwei Zink Fingern besteht und in der C-Region liegt, ist für die Erkennung der DNA Sequenzen verantwortlich [25, 26]. Die D-Domäne bzw. Hinge-Domäne interagiert mit Co-Repressoren [27]. Die Hinge-Domäne verbindet die DNA-Bindungsregion mit der Liganden-Bindungsregion und ermöglicht die Drehbarkeit der DNA-Bindungsregion [28]. Nachdem die Liganden durch die Zellmembran diffundiert sind, binden sie an die Liganden-Bindungsdomäne (Ligand binding domain, LBD), die

in der ligandenabhängigen Aktivierungsregion AF-2 lokalisiert ist [10]. Dies bewirkt eine Konformationsänderung der hydrophoben Tasche der LBD [29]. Durch die Änderung der LBD Struktur resultiert das Abstoßen von Co-Repressoren und die Bindung von Co-Aktivatoren an die AF-2 Domäne [30-32]. Die Co-Aktivatoren bauen das Chromatin um, damit es für die Transkription besser zugänglich wird [33]. Zusätzlich unterstützen sie die Formation eines heterodimeren Komplexes mit RXR im Zellnukleus, welcher im Anschluss mit seiner DBD an spezifische Response Elemente in der Promoter Region (RXRE) von Zielgenen bindet und dadurch die Transkription einleitet [34] (siehe Abbildung 3). In Abwesenheit von Liganden bleiben die Co-Repressoren gebunden und tragen damit zur Unterdrückung der Transkription von Zielgenen bei [35].



**Abbildung 1: Funktioneller Aufbau eines nukleären Rezeptors** Die nicht-steroidalen nukleären Rezeptoren der Subfamilie I und II sind im Zellkern lokalisiert, wo sie als Transkriptionsfaktoren agieren. Die A/B Domäne ist hypervariabel und beinhaltet die AF-1 Region. In der C-Domäne liegt die DNA-Bindungsregion (DBD), die die Ziel-DNA erkennt und dadurch die Genaktivierung initiiert. Die variable D-Domäne wird auch als Hinge-Domäne bezeichnet und interagiert mit Co-Repressoren. Die E/F Domäne beinhaltet die Liganden-Bindungsdomäne (LBD), die Liganden bindet.

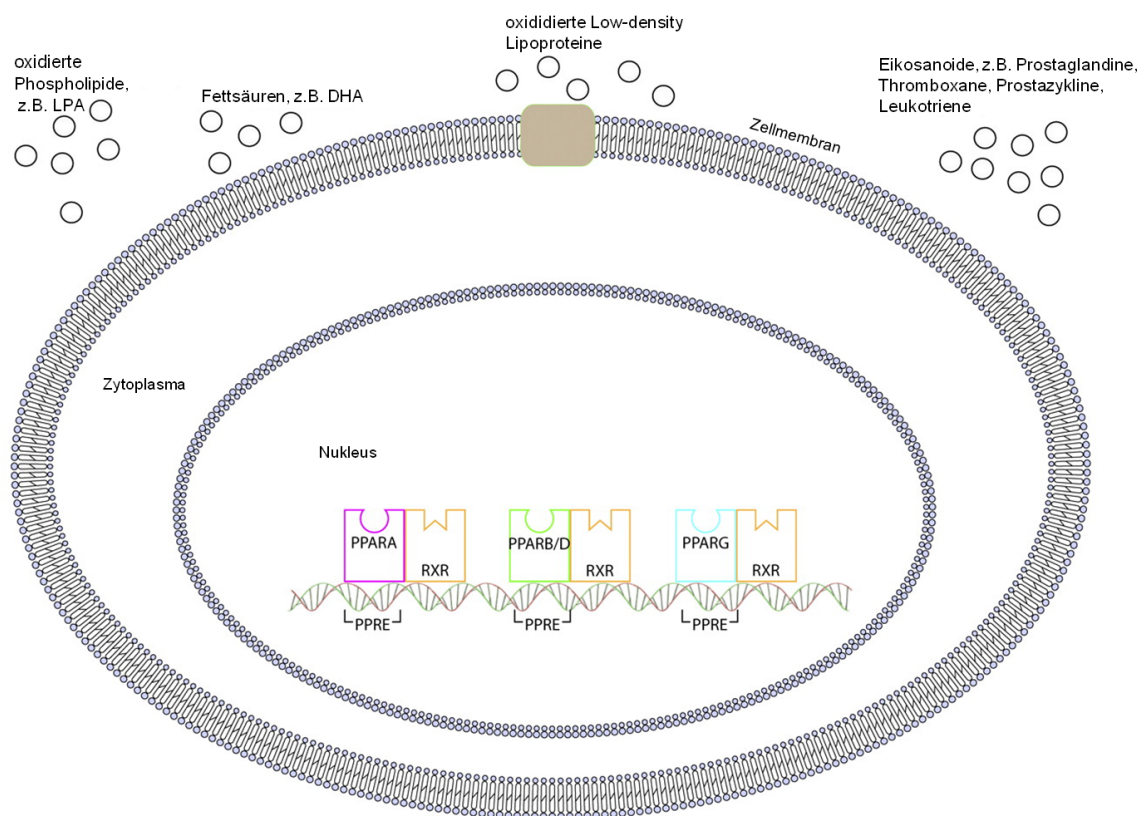
Heterodimere Partner von RXR, die der Subfamilie I zugeteilt werden, sind ebenso wie RXR in verschiedenste physiologische Vorgänge involviert und übernehmen dabei zentrale Aufgaben.

Der VDR beeinflusst u.a. Zelldifferenzierung, Zellwachstum, Insulinsekretion, Knochenaufbau [36] sowie maternale und fetale Kalzium-Homöostase [37]. Während der Schwangerschaft wird der aktive Ligand von VDR, 1,25-Dehydroxyvitamin D<sub>3</sub> (1,25[OH]<sub>2</sub>D<sub>3</sub>), vermehrt von Trophoblasten synthetisiert [37]. Dabei reguliert dieser wesentlich die Dezidualisation, die Implantation, die Progesteron- und Östradiol Synthese, die Laktogen Expression, den Kalziumtransport in die Plazenta und die plazentare Immunreaktion [38-41].

PPARs, von denen die drei Isoformen PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  und PPAR $\gamma$  existieren [7], spielen eine wichtige Rolle im Glukose- und Lipid-Metabolismus und sie sind in Prozesse wie die Angiogenese und Inflammation involviert [42]. In der Schwangerschaft nehmen sie zusammen mit RXR Einfluss auf die Entwicklung der Plazenta, die Trophoblastdifferenzierung und die Invasion [43]. PPAR $\beta/\delta$  und PPAR $\gamma$  Knock-out Mäuse weisen plazentare Defekte auf, die zu einer vermehrten Letalität des Embryos führen [44-48].

Zu den Liganden von PPAR gehören Fettsäuren, Eikosanoide, oxidierte Low-density Lipoproteine (oxLDL) und oxidierte alkalische Phospholipide [49-51] (

Abbildung 2). Ein PPAR Mangel kann zur Entstehung von Diabetes mellitus Typ II beitragen [42]. Thiazolidindione, wie Ciglitazon, Pioglitazon und Rosiglitazon, sind Liganden von PPAR $\gamma$  und werden als Insulin-Sensitizer in der Therapie des Diabetes mellitus Typ II eingesetzt [42, 52].



**Abbildung 2: Transkriptionsaktivierung des heterodimeren Komplexes PPAR/RXR im Zellnukleus [42]** Übersicht über PPAR Liganden, die an die PPAR Rezeptoren binden können, indem sie die Zell- und Kernmembranen penetrieren. Die PPAR Liganden sind oxidierte Phospholipide wie z.B. LPA (Lysophosphatid Säure), Fettsäuren wie z.B. DHA (Docosahexaenoic acid), oxidierte low-density Lipoproteine und Eikosanoide wie Prostaglandine, Thromboxane, Prostazykline und Leukotriene. PPARs sind in einem heterodimeren Komplex mit RXR über PPAR Response Elements (PPRE) an die DNA gebunden.

### 1.3 Schlüsselrezeptor für metabolische Signalwege: der Retinoid-X-Rezeptor

#### 1.3.1 Vorkommen und Funktionen des Retinoid-X-Rezeptors

RXR kann in Form von RXR-RXR als Homodimer fungieren oder mit anderen nukleären Rezeptoren Heterodimere bilden und dadurch deren Transkription aktivieren [16, 17, 53]. Bedingt durch diese Fähigkeit repräsentiert der Retinoid-X-Rezeptor den

entscheidenden Rezeptor in einer Vielzahl von Signaltransduktionen und ist somit multifunktionell als Schlüsselrezeptor in physiologischen Prozessen involviert [54].

Von RXR existieren die drei Isoformen RXR $\alpha$ , RXR $\beta/\delta$  und RXR $\gamma$ , deren Entstehung durch alternatives Spleißen zustande kommt [55]. Während RXR $\beta/\delta$  ubiquitär exprimiert wird, ist RXR $\gamma$  vor allem in der Skelett- und Herzmuskulatur, dem Hypophysenvorderlappen und Gehirn vorzufinden [56-58]. RXR $\alpha$  wird von Nieren-, Leber- und Milzgewebe, der Epidermis und Plazenta exprimiert [10].

1992 identifizierte die Arbeitsgruppe Heymann und Evans 9-*cis*-Retinsäure (9-*cis*RA) als natürlichen Liganden von RXR [59]. Dieser ist 40-fach potenter in der Aktivierung von RXR als die Isotypen all-*trans*-Retinsäure (ATRA) und 13-*cis*-Retinsäure (13-*cis*RA) [55]. Weitere Liganden von RXR sind die ungesättigte Fettsäure Docosahexanoic Acid (DHA) und das Vitamin A Derivat  $\beta$ -apo14'-Carotenal [60, 61].

Alle drei RXR Isoformen sind an der Zellproliferation, Zelldifferenzierung, embryonalen Musterung und der Organogenese beteiligt [62]. Zusammen mit der Thymin-DNA Glykosylase trägt RXR zur DNA Reparatur bei [63]. Weiterhin ist RXR in der Lage, die Nur77/TR3-abhängige Apoptose zu fördern [35].

Im Rahmen ihrer *in vivo* Forschung 1994 demonstrierten Chambon und Kollegen, dass Vitamin A durch Aktivierung der RXR- und RAR-Isoformen die embryologische Entwicklung bei Mäusen wesentlich beeinflusst [64]. Von den RXR-Isoformen nimmt RXR $\alpha$  die wichtigste Rolle während der Entwicklung ein [65]. Die Relevanz von RXR $\alpha$  während der Embryogenese wird auch daran deutlich, dass RXR $\alpha$  Knock-out Mäuse zwischen dem embryologischen Tag (E) E13.5 und E16.5 sterben [66, 67]. *In vivo* Experimente zeigen, dass RXR $\alpha$  homozygote Knock-out Mäuse hauptsächlich aufgrund von Hypoplasien und Defekten der Herzventrikel und einer Ausdünnung der Herzwand sterben [66, 67]. Zudem entwickeln Mäuse mit Fehlern im RXR $\alpha$  Gen schwerwiegende Plazentationsstörungen [68]. Hierzu werden gezählt: inkomplette Verdichtung der Trophoblasten, Zerstörung der Basalmembran zwischen den Trophoblasten und maternale Hämatome in der Junctionszone [68]. Eine funktionelle Redundanz der beiden RXR $\alpha$  Allele wird vermutet, da Mäuse mit einem einzelnen RXR $\alpha$  Allel überlebensfähig sind [65].

Ein Verlust von RXR $\beta/\delta$  oder RXR $\gamma$  hat keine gravierenden Konsequenzen für die embryonale Entwicklung von Mäusen, da RXR $\alpha$  die Fähigkeit besitzt, diesen Defekt auszugleichen [10]. Von den überlebensfähigen Mäusen führt ein RXR $\beta/\delta$  Knock-out Phänotyp zur männlichen Infertilität [62] und ein gleichzeitiger Defekt im RXR $\beta/\delta$  und RXR $\gamma$ -Gen kann Fehler der synaptischen Plastizität und Lerndefekte in der Lokomotion hervorrufen [69].

Während der Embryo- und Morphogenese fungiert RAR als wichtigster heterodimerer Partner von RXR $\alpha$  [70]. Es wird vermutet, dass RXR nur durch die heterodimere

Bindung mit RAR an der Morphogenese beteiligt ist [70]. Andere heterodimere Partner von RXR wie z.B. PPAR, THR, VDR, LXR, PXR und CAR spielen keine essentielle Rolle in der Morphogenese, da Defekte in diesen keine morphologischen Anomalitäten verursachen [70].

Zusammen mit PPAR $\gamma$  beeinflusst RXR $\alpha$  indirekt die Trophoblastendifferenzierung, indem die Rezeptoren die Sekretion von Gestationshormonen, wie z.B. hCG, Laktogen und Leptin, regulieren [71]. Die Produktion von hCG und Laktogen in Synzytiotrophoblasten wird durch die Retinsäuren ATRA und 9-*cis*RA gefördert [34]. Eine Inhibierung von RXR $\alpha$ /PPAR $\gamma$  fördert die Zytotrophoblasteninvasion [43]. Zudem regulieren RXR $\alpha$  und PPAR $\gamma$  die Aufnahme von Fettsäuren in Trophoblasten, die essentiell für die Produktion von Steroidhormonen in der Plazenta und die weitere fetale Entwicklung ist [43, 72].

Holdsworth-Carson *et al.* (2010) untersuchten die RXR $\alpha$  Expression in gestörten Schwangerschaften [73]: Bei präeklampsischen Patientinnen konnte eine erhöhte plazentare Expression von RXR $\alpha$  auf mRNA- und Protein-Ebene nachgewiesen werden [73]. Die RXR $\alpha$  Proteinexpression war in Plazenten von Patientinnen mit Gestationsdiabetes vermindert [73].

#### 1.4 Aktivatoren von RXR und RAR: die Retinoide

Die Vorstufe von Vitamin A, Provitamin A, wird auch als  $\beta$ -Caroten bezeichnet [74]. Vitamin A (Retinol) wird mit der Nahrung vom Körper aufgenommen und von Zellulären-Retinol-bindenden Proteinen (CRBP I-III) in die Leber transportiert [75]. Durch das Enzym Retinol-Dehydrogenase entsteht aus Retinol via Oxidation das Vitamin-A-Aldehyd, das sogenannte Retinal [75]. Dieses wird in einem weiteren Schritt durch die Retinal-Dehydrogenase zu Retinsäure oxidiert [76, 77]. Retinsäure kann in verschiedenen natürlich vorkommenden Stereoisomeren, wie z.B. all-*trans*-Retinsäure (ATRA), 9-*cis*-Retinsäure (9-*cis*RA) und 13-*cis*-Retinsäure (13-*cis*RA), existieren [23, 78]. Die Umwandlung der Retinsäure-Isomeren und die heterodimeren RXR-RAR Komplexe sind in Abbildung 3 dargestellt.

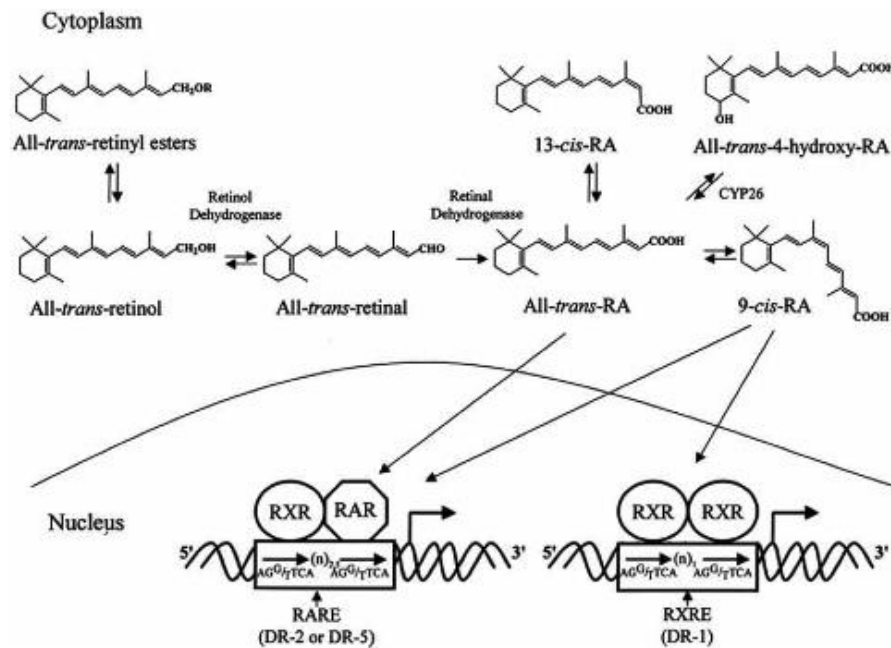
Trophoblasten besitzen die Fähigkeit, Retinol zu synthetisieren [79]. Ob 9-*cis*RA und ATRA aus dem plazentaren Retinol *de novo* entstehen oder dem maternalen Blutfluss entstammen, ist noch nicht geklärt [79]. Die Retinol Konzentration im humanen Blutkreislauf beträgt ca. 1  $\mu$ M ATRA [80].

Retinoide, die RXR und RAR aktivieren können, spielen eine wesentliche Rolle in der embryologischen Entwicklung, beim Zellwachstum und der Zelldifferenzierung [64, 81]. Des Weiteren besitzen sie die Fähigkeit, Apoptose zu induzieren [62, 82]. Altucci *et al.* (2002) fanden heraus, dass RXR-Antagonisten die durch Retinoide induzierte Apoptosetriggerung in akuten Promyelozyten Leukämie-Zellen verhindern können [83].

Das fetale Vitamin A Verlust-Syndrom (VAD-Syndrom) kann zu Defekten im kardiovaskulären-, Respirations- und Skelettsystem führen und Defekte im urogenitalen Trakt sowie Nierenhypoplasien verursachen [84-88]. Zusätzlich kann das VAD-Syndrom in Blindheit des Neugeborenen resultieren [89]. Die aus dem VAD-Syndrom entstehenden pleiotropen kongenitalen Malformationen verdeutlichen die weitreichenden Effekte von Vitamin A auf die embryonale Entwicklung.

Ein zu hoher Vitamin A Gehalt ist jedoch ebenfalls schädlich für die Entwicklung des Feten, da eine vermehrte Vitamin A Dosis teratogen wirkt [90]. Malformationen können durch orale, aber auch intraperitoneale und subkutane Vitamin A Zufuhr entstehen [78]. Die orale Einnahme von 13-*cis*RA zur Therapie der Akne vulgaris oder der Psoriasis während der 2. – 5. Woche p.c. resultiert in schweren kongenitalen Malformationen, die unter dem Begriff Retinsäure Embryopathie (RAE) zusammengefasst werden [91, 92]. Typisch für die RAE sind kraniofasziale Malformationen. Da Retinsäuren eine lange Halbwertszeit haben und im Fettgewebe gespeichert werden, besitzen sie nach Therapieende weiterhin teratogene Effekte [93, 94]. Somit dürfen Patientinnen auch noch Monate nach Beendigung einer regulären Vitamin-A-Derivat Einnahme nicht schwanger werden [95]. Die teratogenen Nebenwirkungen werden durch die Aktivierung des Heterodimers RXR/RAR $\beta$  hervorgerufen, wovon RAR $\beta$  einen größeren Einfluss nimmt als RXR [96]. Mark *et al.* (2006) betonen jedoch, dass die Retinoide, die an RAR binden und damit teratogene Nebenwirkungen verursachen, nicht die gleichen Retinoide sind, die während der Entwicklung an den physiologischen Signalwegen beteiligt sind [96].

Kochhar *et al.* (1996) demonstrierten, dass Mausfeten, die am 11. Gestationstag einer Überdosis an Retinoiden ausgesetzt sind, Malformationen der Extremitäten und kraniofasziale Defekte wie die Mund-Kiefer-Gaumen Spalte entwickeln [97]. Während eine Konzentration von 10 mg/kg ATRA bei 23% der Mausfeten Malformationen hervorriefen, hat eine 10-fache Erhöhung der Konzentration (100 mg/kg) 100% der Feten betroffen [97]. Die Arbeitsgruppe identifizierte das synthetische 4-[(E)-2-(5,6,7,8-Tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthalenyl)-1-propenyl] benzoic acid (TTNPB) als das Retinoid mit den gravierendsten teratogenen Effekten in Mausfeten bei geringster Konzentration (0,01 mg/kg).



**Abbildung 3: Darstellung der Umwandlung der Retinsäure-Stereoisomeren und der Bindung der RXR/RXR und RXR/RAR Heterodimere an die Response Elemente RXRE und RARE [78]** Abbildung der chemischen Strukturen der Retinsäure-Isoformen. Diese entstehen initial aus Retinol, das vom Zytoplasma zur Leber transportiert wird. Dort wird es durch die Retinol-Dehydrogenase und die Retinal-Dehydrogenase zu Retinsäure umgewandelt. Nach Bindung der Retinsäuren an RXR und RAR, binden die heterodimeren Komplexe an die Response Elemente, wodurch die Gentranskription aktiviert wird.

#### 1.4.1 Pharmakologischer Einsatz und Nebenwirkungen von Retinoiden

Gegenwärtig finden Retinoide vor allem Anwendung in der Therapie Akuter Promyelozytärer Leukämien [98, 99]. Retinoide werden des Weiteren bei dermatologischen Erkrankungen wie z.B. der Akne vulgaris, der Psoriasis und der Rosazea als Therapeutikum verwendet [92, 100, 101] und könnten in Zukunft ebenfalls bei Morbus Alzheimer therapeutisch eingesetzt werden [102, 103].

Zusätzlich zu teratogenen Nebenwirkungen, können Retinsäuren eine Hypertriglyceridämie [104] und ophthalmologische Nebenwirkungen wie beispielsweise eine Cheilitis [105] verursachen.

#### 1.5 Aktivatoren von PPAR: die Prostaglandine

Eine wichtige Gruppe der PPAR Agonisten stellen die Prostaglandine dar. Sie werden der Familie der Eikosanoide zugeteilt [106]. Durch Cyclooxygenasen-Enzyme (COX1- und COX-2) entsteht aus der Arachidonsäure das Prostaglandin  $H_2$ , welches sich über Prostaglandin-Synthasen zu weiteren Prostaglandin-Derivaten entwickeln kann [107]. Aus  $PGD_2$  entsteht 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin  $J_2$  (15d- $J_2$ ) [108, 109], welches an  $PPAR\gamma$  [110, 111] und  $PPAR\alpha$  bindet [112].



15d-J<sub>2</sub> besitzt die Möglichkeit zur Induktion der Adipogenese [111]. Zusammen mit seinem Rezeptor PPAR $\gamma$  spielen sie eine Rolle in der Entwicklung von Adipozyten und der Glukose-Homöostase [111].

Während der Schwangerschaft verhindert 15d-J<sub>2</sub> die Differenzierung und Invasion von Trophoblasten [71] und fördert deren Apoptose [113]. In der Chorionkarzinomzelllinie JEG-3 [114], in Makrophagen [115-117] und in Endothelzellen [118], besitzt 15d-J<sub>2</sub> ebenfalls die Fähigkeit zur Apoptoseinduktion. Zudem kann 15d-J<sub>2</sub> einen anti-inflammatorischen Effekt während der Schwangerschaft bewirken, indem es die Ausschüttung von Interleukinen und TNF $\alpha$  hemmt [119].

Ein Gestationsdiabetes entsteht vermutlich aufgrund einer Dysregulation von PPAR [42]. Zudem ist bei Patientinnen mit Diabetes mellitus der Anteil von Stickstoffoxid in der Plazenta erhöht [120]. Die Zufuhr von exogenem 15d-J<sub>2</sub> kann die Produktion von Stickstoffoxid in Plazenten reduzieren [120]. Somit vermutet man, dass 15d-J<sub>2</sub> die Entwicklung eines Gestationsdiabetes beeinflussen kann, indem es zur Verbesserung der placentaren und fetalen Entwicklung beiträgt [42]. Ein erhöhter Anteil an 15d-J<sub>2</sub> im Serum von Schwangeren, die an Diabetes mellitus leiden, könnten zur Wiederherstellung der Glukose-Homöostase agieren [42].

Thiazolidindione, wie beispielsweise Ciglitazon, Pioglitazon und Rosiglitazon, sind PPAR $\gamma$  Agonisten und finden Anwendung bei Patienten/innen mit Diabetes mellitus Typ 2 [42, 52]. Zudem werden PPAR $\gamma$  Agonisten wie Thiazolidindione bei Patientinnen mit Polyzystischem Ovar Syndrom (PCOS) eingesetzt [121].

## **1.6 Der Leptin Rezeptor und sein Ligand Leptin**

### **1.6.1 Interaktion zwischen Leptin und den nukleären Rezeptoren RXR $\alpha$ und PPAR $\gamma$**

Leptin ist ein Zielgen des nukleären Rezeptors PPAR $\gamma$  und somit auch ein Zielgen von RXR $\alpha$ , dem heterodimeren Partner von PPAR $\gamma$  [79, 122]. Eine liganden-abhängige Aktivierung von PPAR $\gamma$  verursacht eine Inhibierung der Leptin Expression *in vitro* in Sternzellen der Leber und in isolierten Fettzellen [123, 124]. RXR $\alpha$  und PPAR $\gamma$  sind vermutlich auch an der Regulation von Leptin in der Plazenta beteiligt [125]. So können RXR Agonisten beispielsweise die Leptin Expression regulieren und dadurch den Schwangerschaftsverlauf positiv beeinflussen [34, 71]. Die spezifischen regulatorischen Signalwege, die eine Interaktion zwischen PPAR und Leptin ermöglichen, sind bisher nicht geklärt [126].

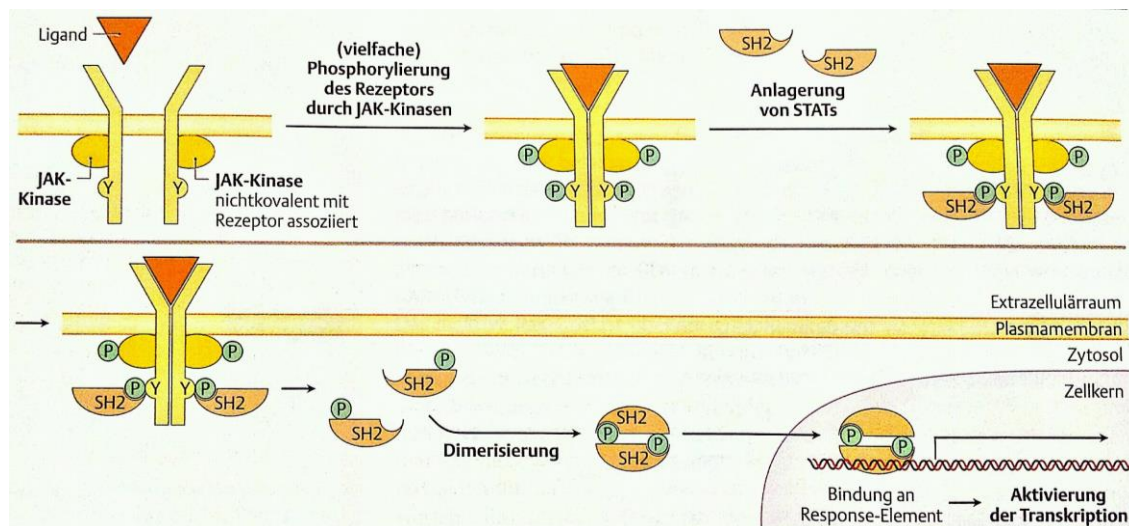
### 1.6.2 Isoformen und Signaltransduktion des Leptin Rezeptors

Leptin ist ein Ligand des Leptin Rezeptors (ObR, Synonym: LEPR). Dieser gehört zur gp130 Familie der Zytokin Rezeptoren [127]. Über seine zytosolische Domäne ist ObR mit Tyrosinkinase assoziiert, da er keine eigene Tyrosinkinaseaktivität besitzt [77]. Durch alternatives Spleißen entstehen die sechs Ob-R Isoformen: ObRa, ObRb, ObRc, ObRd, ObRe und ObRf [128]. Diese können in drei Untergruppen unterteilt werden: ObRb wird zu den langen Isoformen gezählt, als kurze Isoformen werden die Isoformen ObRa, ObRc, ObRd und ObRf bezeichnet und die dritte Gruppe beinhaltet die lösliche ObRe Isoform [129].

1999 beschrieben Bodner *et al.* die mRNA der langen ObR Isoform im Zytoplasma und ObR Protein in der apikalen Membran von Synzytiotrophoblasten [130]. Zytotrophoblasten und Synzytiotrophoblasten der humanen Plazenta exprimieren die kurzen und langen Isoformen von ObR [131]. Im Endometrium und im menschlichen Ovar wurde ObR zusätzlich nachgewiesen [132, 133]. Der Leptin Rezeptor spielt vermutlich eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Schwangerschaft [134].

Die im Hypothalamus vermehrt vorkommende ObR Isoform reguliert den Fettstoffwechsel [128]. In Abwesenheit dieses Rezeptors entwickeln Mäuse eine Adipositas [128]. Des Weiteren kann eine Mutation im ObR einen Gestationsdiabetes in schwangeren Mäusen hervorrufen [135].

Die Signaltransduktion des Leptin Rezeptors beginnt initial mit der Ligandenbindung von Leptin an den Rezeptor [136, 137] (Abbildung 4). Diese führt zur Dimerisierung zweier Leptin Rezeptoren [77]. Die Aggregation zweier Leptin Rezeptoren wird durch die Strukturumwandlung des Rezeptors, die durch die Ligandenbindung induziert wird, gefördert [138]. Da die Zytokin Rezeptoren keine eigene Enzymaktivität besitzen, benötigen sie zur Aktivierung der intrazellulären Signalkaskade die Januskinasen (JAK) [77]. Nachdem die JAK an den ObR andockt, phosphoryliert die JAK Tyrosinreste von ObR und kreiert dadurch Bindungsstellen für die Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) Proteine [77, 139]. Nach Bindung der STAT Proteine werden diese an einem Tyrosinrest durch JAK phosphoryliert [77]. Die STAT Dimere der aggregierten ObR wandern in den Zellkern ein und induzieren daraufhin die Transkription der Zielgene [140].



**Abbildung 4: Aktivierung des Leptin Rezeptors** [141] Der ObR wird über die Signaltransduktion durch rezeptorassoziierte Tyrosinkinasen (JAK-STAT-Signaltransduktionsweg) aktiviert. Die JAK bindet an den ObR und phosphoryliert daraufhin das STAT Protein. Das phosphorylierte STAT Protein wird in den Nukleus zur DNA transloziert.

### 1.6.3 Funktionen von Leptin

Aus dem Obese (*db*) Gen entsteht Leptin [128], welches zur Familie der long-chain helical Zytokinen gezählt wird [142]. Im Hypothalamus stimuliert Leptin die metabolische Rate und unterdrückt den Appetit [143]. Leptin wird ebenfalls von weißem Fettgewebe, Magenepithel und Gehirnzellen exprimiert [144-147]. Es besitzt regulatorische Funktionen in der Angiogenese [148, 149], Homöostase [150], Hämatopoese [151], Thermogenese [152] und Chondrogenese [153] und beeinflusst zusätzlich neuroendokrine und immunologische Prozesse [151, 154, 155]. Letzteres beeinflusst Leptin, indem es z.B. als proinflammatorisches Zytokin in Monozyten und Lymphozyten agiert und dadurch die Produktion von Th1-Typ Zytokinen fördert [156, 157].

Des Weiteren nimmt Leptin Einfluss auf reproduktive Prozesse [155, 158]. Während der Schwangerschaft steigt die maternale Leptin Konzentration an und sinkt nach der Geburt wieder ab [146, 159]. Leptin beeinflusst den Schwangerschaftsverlauf, indem es die Funktion und Reifung der Ovarien und die Entwicklung des Embryos reguliert [160-163]. Zudem fördert Leptin die Proliferation von Trophoblasten, das fetale Wachstum und die Laktation [164, 165]. Durch Förderung der Matrix Metalloproteinasen (MMP) Expression in Zytotrophoblasten spielt Leptin eine wichtige Rolle bei der Implantation [166].

In Osteoblasten, Monozyten, eosinophilen Granulozyten und weiteren Zellen wirkt Leptin anti-apoptotisch [167-169]. In Trophoblasten übt Leptin ebenfalls eine anti-

apoptotische Wirkung aus [131]. Die Apoptose verhindernde Eigenschaft von Leptin wird hauptsächlich über den MAPK-Signalweg sichergestellt [170].

Die Leptin Konzentration ist bei Schwangerschaftspathologien, wie der Präeklampsie [171], dem Gestationsdiabetes [172] und bei den gestationsbedingten Trophblasttumorerkrankungen erhöht [146, 173]. Perez-Perez *et al.* (2008) begründeten die Zunahme der Leptin Expression in pathologisch veränderten Schwangerschaftszuständen damit, dass eine Erhöhung der Leptin Konzentration vermutlich als Schutz vor einer stressinduzierten Apoptose in Trophoblasten dient [170].

### **1.7 Expression des Retinoid-X-Rezeptors $\alpha$ , des Leptin Rezeptors und Leptins in Abortplazenten**

Die Rezeptoren RXR $\alpha$  und ObR beeinflussen wesentlich den Schwangerschaftsverlauf. Die Arbeitsgruppe von Toth und Jeschke *et al.* hat im Rahmen vorheriger Studien die Expression von RXR $\alpha$  (2008) sowie ObR (2009) und seinem Liganden Leptin (2008) in Ersttrimesterplazenten von Aborten detektiert [125, 174]. Es stellte sich heraus, dass sowohl RXR $\alpha$  wie auch ObR in villösen Trophoblasten (VT) bzw. Synzytiotrophoblasten und extravillösen Trophoblasten (EVT) von Aborten (7.-12. SSW) im Vergleich zu VT und EVT der gesunden Kontrollen (7.-12. SSW), vermehrt exprimiert werden (Tabelle 2). Zusätzlich konnte eine erhöhte ObR Expression in glandulär epithelialen Zellen der Dezidua von Aborten im Vergleich zu regelrecht verlaufenden Schwangerschaften nachgewiesen werden. Die vermehrte ObR Expression in EVT in Aborten konnte auf mRNA Ebene mit Hilfe der quantitativen Real-time PCR (TaqMan®-PCR) verifiziert werden. Hierbei stellte sich heraus, dass die mRNA Expression des intakten ObR im Abort, der die Exon Boundaries 19-20 besitzt, im Vergleich zur ObR mRNA Expression der normalen Schwangerschaften ( $p < 0.05$ ) um das 4,8-fache signifikant erhöht war. Weiterhin war die kurze ObR Isoform mit den Exon Boundaries 6-7 im Abort im Gegensatz zur Kontrolle um das 2,2-fache erhöht. Die anderen Spleißvarianten von ObR waren in ihrer Expression im Abort im Vergleich zur regelrechten Schwangerschaft nicht signifikant verändert.

Die Leptin Expression war in VT von Aborten im Vergleich zu VT von Kontrollen signifikant reduziert, in EVT von Abortplazenten hingegen war keine wesentliche Veränderung der Leptin Expression erkennbar (Tabelle 2) [125]. Auf die Funktionen, Eigenschaften und Relevanz von RXR $\alpha$  und ObR im Abort, wird in der vorliegenden Arbeit näher eingegangen.

Expression im Abort	VT	EVT
<b>RXR<math>\alpha</math></b>	↑	↑
<b>ObR</b>	↑	↑
<b>Leptin</b>	↑	↔

**Tabelle 2: RXR $\alpha$ -, ObR- und Leptin Expression in VT und EVT von Aborten im Vergleich zur Expression in VT und EVT von gesunden Schwangerschaften** (↑= Hochregulation/Up-Regulation, ↔ = keine Veränderung in der Expression, ↓: Runterregulation/Down-Regulation) [125, 174]

## 1.8 Molenschwangerschaft

Die Blasenmole ist ein benigner trophoblastärer Schwangerschaftstumor, der von den Chorionzotten der Plazenta ausgeht [2]. Sie entsteht durch eine defekte Embryonalanlage, bei der die Embryoblasten zugrunde gehen und die Trophoblasten weiterhin persistieren [2, 125]. Nach einer hydrophisch-ödematösen Degeneration der Chorionzotten der Plazenta sowie Proliferation der Zyto- und Synzytiotrophoblasten [125] kommt es zum Absterben der Embryonalanlage [2]. Zu unterscheiden von der hydatiformen Mole ist die destruierende invasive Blasenmole, bei der eine Invasion der Trophoblasten in das Uterusmyometrium stattfindet [2]. Die Blasenmole kann sich klinisch durch einen vergrößerten Uterus, uterine Blutung, Gestosezeichen und eine Hyperemesis gravidarum äußern [2].

## 1.9 Expression des Retinoid-X-Rezeptors $\alpha$ , des Leptin Rezeptors und Leptins in der Blasenmole

Im Rahmen vorheriger Studien hat die Arbeitsgruppe Toth und Jeschke *et al.* (2008) die Expression von RXR $\alpha$  in VT und EVT von Blasenmolen (7.-12. SSW) und normalen Schwangerschaften (7.-12. SSW) untersucht [125]. Die RXR $\alpha$  Expression in VT der Blasenmole war gegenüber der Kontrolle signifikant ( $p < 0.05$ ) erhöht, wie Li *et al.* (2004) ebenfalls feststellen konnten [175]. In EVT der Blasenmole konnte eine verminderte Expression von RXR $\alpha$  im Vergleich zur regelrecht verlaufenden Schwangerschaft detektiert werden (Tabelle 3). Zudem wurde die Leptin Expression in VT und EVT von gesunden Plazenten mit der Leptin Expression in VT und EVT von Blasenmolen verglichen. In VT der Blasenmolen war eine eindeutig signifikante Zunahme der Leptin Expression zu erkennen (Tabelle 3). Die EVT wiesen hinsichtlich der Leptin Expression keinen Unterschied auf. Die Expression des Leptin Rezeptors (ObR) in VT, EVT und in glandulär epithelialen Zellen der Dezidua der Blasenmole gegenüber der normalen Schwangerschaft wurde ebenfalls von der Arbeitsgruppe Toth und Jeschke *et al.* (2009) untersucht [125, 174]. Es konnte demonstriert werden, dass in VT, EVT und Deziduazellen der Blasenmole eine signifikante Zunahme der ObR

Expression im Vergleich zu dessen Expression in VT und EVT der Kontrolle erfolgt (Tabelle 3).

Expression in der Blasenmole	VT	EVT
<b>RXR<math>\alpha</math></b>	↑	↓
<b>ObR</b>	↑	↑
<b>Leptin</b>	↑	↔

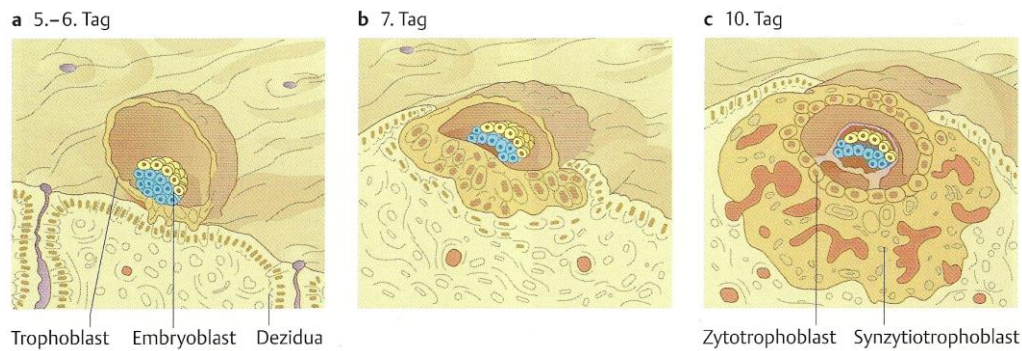
**Tabelle 3: RXR $\alpha$ -, ObR- und Leptin Expression in VT und EVT in der Blasenmole im Vergleich zur Expression in VT und EVT von gesunden Schwangerschaften** (↑= Hochregulation/Up-Regulation, ↔ = keine Veränderung in der Expression, ↓: Runterregulation/Down-Regulation) [125, 174]

## 1.10 Trophoblastzellen

### 1.10.1 Genese der Trophoblastzellen

Die regelhafte Plazentaentwicklung ist Voraussetzung für eine regelrecht verlaufende Schwangerschaft und essentiell für die fetale Entwicklung. Über die Plazenta werden Nährstoffe und Stoffwechselprodukte transportiert und sie stellt den Austausch von O<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> zwischen mütterlichem und fetalem Blut sicher [176]. Die Plazenta produziert humanes Choriogonadotropin (hCG), humanes Plazentalaktogen (HPL), Östrogen und Progesteron und fungiert des Weiteren als immunologische Barriere für den Embryo [2].

Am 3. – 4. Tag nach der Befruchtung (post conceptionem = p.c.) entwickelt sich die in der Tuba uterina befindende Morula (4- bis 8-Zellenstadium) zur Blastozyste [2]. Aus dieser bildet sich die Blastozystenhöhle, die aus einer inneren Zellmasse, dem sog. Embryoblasten, und einer äußeren Trophoblastschicht aufgebaut ist [2]. Aus dem Embryoblast entsteht später der Embryo und aus der äußeren Trophoblastschicht entwickeln sich die Plazenta und die Eihäute [3]. Es folgt das sog. Hatching („Schlüpfen“), bei dem sich die Blastozyste aus der Zona pellucida löst [2]. Am 5. bis 6. Tag p.c. erreicht die Blastozyste den Uterus und die Implantation beginnt (Abbildung 5) [2]. Der Trophoblast adhäriert und invadiert in das Endometrium, differenziert sich zu einkernigen Zytotrophoblasten, die die innere Zellschicht bilden und die Blastozyste umgeben und zu den außen liegenden mehrkernigen Synzytiotrophoblasten, die aus der Fusion von villösen Zytotrophoblasten entstehen [2]. Durch Gewebeseinschmelzung im Synzytiotrophoblasten entwickeln sich Lakunen [3]. Am 10. bis 12. Tag p.c. werden die Lakunen durch Arrosion von Blutgefäßen mit der maternalen Zirkulation verbunden [3].



**Abbildung 5: Stadien der Implantation [177]** **a** Tag 5 – 6 p.c.: Adhäsion des Trophoblasten an das Uterusendometrium. **b** Tag 7 p.c.: Enzymatische Auflösung der Dezidua. **c** Tag 10 p.c.: Beginn der Plazentation; Proliferation des Synzytiotrophoblasten und Eröffnung der maternalen Gefäße.

Während der Plazentation entstehen durch die Proliferation von Zytotrophoblasten und deren Einwachsen in Trabekeln die Primärzotten [3]. Die Verschmelzung mit der Endometriumbasis (Decidua basalis) und das Einwachsen von Mesenchym bedingt die Differenzierung der Primärzotten zu Sekundärzotten [2]. Das Eindringen der embryonalen Blutgefäße in die Sekundärzotten führt wiederum zur Reifung der Sekundärzotten zu Tertiärzotten [2]. Die Verbindung dieser Gefäße mit den Nabelschnurgefäßen führt zur Entwicklung des uteroplazentaren Kreislaufs, der den Austausch zwischen maternalem und fetalem Blut sicherstellt [2, 3].

Der Trophoblast besteht aus dem extravillösen Trophoblasten (EVT) und dem villösen Trophoblasten (VT) [166]. Letzterer wiederum besteht aus dem Synzytiotrophoblasten und dem Zytotrophoblasten [166]. Der EVT entwickelt sich aus den trophoblastären Zellsäulen [178] und differenziert sich weiter zum interstitiellen und endovaskulären Zytotrophoblasten [176]. Der endovaskuläre EVT beteiligt sich an der Primärzottenbildung [176], indem er intravaskulär in die Arterienwände einwandert und diese umbaut, um ein größeres Blutvolumen den Fetus sicher zustellen [179]. Der interstitielle EVT dringt durch die Dezidua und ist an der Verankerung der Plazenta beteiligt [3].

### 1.10.2 Trophoblastzellen-Modell: BeWo und JEG-3

Für die vorliegende Studie wurden die Zelllinien BeWo und JEG-3 verwendet, die beide RXR $\alpha$  [180] und ObR exprimieren [131]. Sie repräsentieren ein geeignetes Modell für Trophoblastzellen, da sie ähnliche morphologische, biochemische und endokrine Charakteristika wie Trophoblastzellen besitzen [181]. Die Trophoblasttumorzellen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Synzytiumbildung: Während BeWo Zellen Fusionseigenschaften aufweisen, ist für JEG-3 Zellen ein invasives Wachstum charakteristisch [182-184]. BeWo Zellen besitzen Zytotrophoblasten- und Synzytiotrophoblasten-ähnliche Phänotypen und entsprechen daher morphologisch eher VT [185].

Beide Zelllinien, BeWo und JEG-3, werden aus Chorionkarzinomen isoliert. Hierbei handelt es sich um eine maligne Entartung von Zyto- und Synzytiotrophoblastanteilen [2], die zu den malignen Gestational Trophoblastic Neoplasias (GTN) gezählt werden [186]. Chorionkarzinome werden durch malignes Wachstum, Uterusmyometriuminvasion und Metastasierung charakterisiert und können z.B. nach normal verlaufenden Schwangerschaften, Blasenmolen und Aborten auftreten [2, 186].

### **1.10.3 Bedeutung der Apoptose in der Schwangerschaft**

Bei Spontanaborten ist die Invasionstiefe des EVT in das Myometrium geringer als bei regelrecht verlaufenden Schwangerschaften [187, 188]. Einer verminderten Invasion des EVT in den ersten Schwangerschaftswochen folgt ein unvollständiger Umbau der Spiralarterien [189], der als Konsequenz zu plazentarem oxidativem Stress führen kann [190, 191]. Trophoblasten reagieren auf eine maternale immunologische Dysregulation und oxidativen Stress mit der Aktivierung des intrauterinen pro-apoptotischen Fas/Fas Ligand (FasL) Systems [191]. Der Fas Ligand (FasL) gehört zur Familie der Tumornekrosefaktoren und durch Bindung an seinen Rezeptor Fas induziert er Apoptose [192, 193]. Minas *et al.* (2007) konnten zeigen, dass in Aborten deziduale Leukozyten, die positiv für FasL sind, und EVT, die eine vermehrte Anzahl an Fas exprimieren, vorzufinden sind [191]. Zudem konnten sie einen Zusammenhang zwischen spontanen Aborten und einer vermehrten Anzahl an apoptotischen interstitiellen EVT aufweisen. Die Peptide Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) und Urocortin (Ucn), die die Stressinduktion regulieren, sind im spontanen Abort signifikant erhöht [194]. Minas *et al.* (2007) wiesen daraufhin, dass CRH und Ucn die FasL Expression in dezidualen Leukozyten von Abortplazenten induzieren und somit die Fähigkeit der dezidualen Leukozyten, die Fas-vermittelte Apoptose in EVT einzuleiten, verstärkt wird [191]. Die Vermutung, dass das intrauterine Fas/FasL System von Trophoblasten verwendet wird, um einen maternalen Immunangriff zu verhindern, kann in Erwägung gezogen werden [191].



### 1.11 Zentrale Problemstellung und Zielsetzung

Der Retinoid-X-Rezeptor  $\alpha$  (RXR $\alpha$ ) gehört zu der Superfamilie der nukleären Rezeptoren [195] und spielt eine zentrale Rolle in der Zelldifferenzierung, Organogenese und neonatalen Entwicklung [62]. Der Leptin Rezeptor (ObR, LEPR), eine Rezeptor Tyrosinkinase [127], und sein Ligand Leptin, nehmen Einfluss auf den Schwangerschaftsverlauf [158]. In vorherigen Studien hat die Arbeitsgruppe von Toth und Jeschke *et al.* (2008 und 2009) die Expression von RXR $\alpha$  [125] und ObR [174] in der normalen und der gestörten humanen Frühschwangerschaft untersucht, um ein besseres Verständnis über den möglichen Einfluss der beiden Rezeptoren auf die plazentare und fetale Entwicklung zu erhalten. Die Expression von RXR $\alpha$  und ObR in villösen (VT) und extravillösen Trophoblasten (EVT) von Abortplazenten war dabei jeweils erhöht. Die Rezeptoren RXR $\alpha$  und ObR scheinen somit eine wichtige Rolle beim Abortgeschehen zu spielen. Zudem konnte mittels Doppelimmunfluoreszenzfärbungen demonstriert werden, dass Abortplazenten eine vermehrte Anzahl an apoptotischen EVT aufweisen [191]. Die gewonnenen Erkenntnisse der Studien von Toth und Jeschke *et al.* (2008 und 2009) und die Erkenntnisse über die Bedeutung der Apoptose in der Schwangerschaft durch Minas und Jeschke *et al.* (2007) sind Grundlage für die vorliegende Arbeit [125, 174, 191].

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die (patho-) physiologische Rolle von RXR $\alpha$  und ObR in der gestörten Frühschwangerschaft weiter zu analysieren. Diese Zielsetzung beinhaltete zum einen die Untersuchung des Einflusses von Liganden auf die Expression der Rezeptoren in Trophoblasten und Trophoblasttumorzellen. Des Weiteren war die Analyse der Bedeutung einer daraus folgenden vermehrten oder verminderten Expression dieser Rezeptoren für die Frühschwangerschaft ein Teilaspekt dieser Zielsetzung. Ein zusätzlicher Fokus lag auf dem Nachweis, ob Unterschiede hinsichtlich der Expression von RXR $\alpha$  und ObR auf mRNA- im Vergleich zur Proteinebene existieren.

Da aus vorherigen Studien eine Assoziation von apoptotischen EVT und Aborten erkennbar war, sollte ebenfalls die Bedeutung der Rezeptoren RXR $\alpha$  und ObR in apoptotischen Prozessen identifiziert und die Rolle der Rezeptoren in der Apoptoseinduktion geprüft werden.

Ergänzend dazu galt die Fragestellung, ob RXR $\alpha$  und ObR in Zukunft als pharmakologische Zielrezeptoren in der Prävention von rezidivierenden Aborten Verwendung finden können.

## 2 Material

### 2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Bezugsquelle
Adhesive Film (Abdeckfolie) MicroAmp® für RT-PCR	Applied Biosystems, Darmstadt, DE
Adhesive Film Applikator MicroAmp®	Applied Biosystems, Darmstadt, DE
Amberfarbene 1,5 ml Reaktionsgefäße zur Lagerung der UV-sensitiven Retinoide	Brand, Wertheim, DE
Chamberslides, 8-Well	Nalge-Nunc, Rochester, USA
Deckgläser „Thermo Scientific“ 24x60mm	Menzel-Gläser, Braunschweig, DE
Digitales Kamerasystem, AxioCam MRm	Carl Zeiss, Oberkochen, DE
Eppendorf-Reaktionsgefäße, 2ml	Eppendorf, Hamburg, DE
Fluoreszenzmikroskop Axioskop	Carl Zeiss, Oberkochen, DE
Gefrierschrank, -20°C	Siemens, München, DE
Gefrierschrank, -80°C	Thermo Scientific, Waltham, USA
Kamerasystem JVC	JVC, Yokohama, Japan
Kryoröhrchen	Simport, Beloeil, Kanada
Kühlschrank, 4°C	Liebherr, Biberach an der Riss, DE
Lichtmikroskop Diaplan	Leitz, Wetzlar, DE
Mastercycler Gradient für Reverse Transkription	Eppendorf, Hamburg, DE
NanoPhotometer™ für RNA-Extraktion	Implen, München, DE
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen, DE
NucleoSpin-Filter für RNA-Extraktion	Macherey-Nagel, Düren, DE
NucleoSpin® RNAII Säule für RNA-Extraktion	Macherey-Nagel, Düren, DE
Objektträger Superfrost®	Menzel-Gläser, Braunschweig, DE
Optical Fast 96-Well-Platte für RT-PCR	Applied Biosystems, Foster City, USA
PCR Eppendorf Reaktionsgefäße, 0,5ml	Eppendorf, Hamburg, DE

Pipetten	Eppendorf, Hamburg, DE
Pipettenspitzen, 1 µl – 50µl	Eppendorf, Hamburg, DE
Pipettierhilfe „Pipet Boy“	Eppendorf, Hamburg, DE
Pipetten für Pipet Boy 2 ml – 25 ml, Falcon	Becton Dickinson, New-Jersey, USA
QuadriPERM (Zellkulturgefäß)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Reagenzgläser	Sommerschmied, Appen, DE
RNase-freie Reaktionsgefäße	Biozym, Oldendorf, DE
Rüttler	Edmund Bühler, Hechingen, DE
Sammelgefäß für RNA-Extraktion	Macherey-Nagel, Düren, DE
Epson Perfection Scanner 3170 Photo	Epson, Long Beach, USA
Spektralphotometer Ultrospec 3100 pro	GE Healthcare, Buckinghamshire, E
Sterilwerkbank	Uniequip, Planegg, DE
Sterile Filter Spitzen	Biozym, Hessisch Oldendorf, DE
Stickstofftank	Talor-Wharton, Theodore, USA
Tischzentrifuge Mini Spin®	Eppendorf, Hamburg, DE
Tubes, 50 ml, Falcon	Beckton Dickinson, New-Jersey, USA
Waage „Sartorius“	Kremer und Kreiler Laborgeräte, München, DE
Wärmeschrank	Binder, Tuttlingen, DE
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik mbH (GFL), Burgwedel, DE
Wellplatten Multiwell™, 24-Well	Falcon, Beckton Dickinson, New-Jersey, USA
Zellkulturflasche T75 cm <sup>2</sup>	Falcon Becton Dickinson Labware, New-Jersey, USA
Zellscraper	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Zentrifuge	Hermle, Wehingen, DE

## 2.2 Chemikalien

Bezeichnung	Bezugsquelle
Aqua dest.	B. Braun, Melsungen, DE
Ethanol	Apothekenbedarf der LMU, München, DE
Methanol	Apothekenbedarf der LMU, München, DE

## 2.3 Lösungen

Bezeichnung	Bezugsquelle
Dulbeccos Medium (DMEM) (+10% fetales Kälberserum (FCS), 3,7 g/l NaHCO <sub>3</sub> , 4,5 g/l D-Glucose, 1,028 g/l stable glutamine, Na-Pyruvate)	Biochrom, Berlin, DE
DMSO (Dimethylsulfoxid) Cell culture freezing medium	Gibco®, Life Technologies, Carlsbad, USA
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA, Pasching, A
PBS Dulbecco	Biochrom, Berlin, DE
Trypanblaulösung 0,4%	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin/EDTA-Lösung (0,5g / 0,2 g)	Biochrom, Berlin, DE

## 2.4 Substanzen

Bezeichnung	Bezugsquelle
9- <i>cis</i> -Retinsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
All- <i>trans</i> -Retinsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ prostaglandin J <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

## 2.5 Antikörper

### 2.5.1 Immunzytochemie

Bezeichnung	Bezugsquelle
Anti human RXR $\alpha$ mouse monoclonal IgG2a antibody, Klonnummer: K8508, 1 mg/ml	PPMX Perseus Proteomics, Tokyo, JP
Anti-human leptin receptor mouse IgG2B monoclonal antibody, Klonnummer: 52263, 500 $\mu$ g/ml	R&D Systems, Minneapolis, USA
Maus IgG Präimmunserum, 100 mg/L	Dako, Glostrup, DK

### 2.5.2 Western Blot

Bezeichnung	Bezugsquelle
Anti human RXR $\alpha$ mouse monoclonal IgG2a antibody, Klonnummer: K8508	PPMX Perseus Proteomics, Tokyo, JP

### 2.5.3 Dotblot

Bezeichnung	Bezugsquelle
Anti-human leptin receptor mouse IgG2B monoclonal antibody, Klonnummer: 52263, 500 $\mu$ g/ml	R&D Systems, Minneapolis, USA

### 2.5.4 Doppelimmunfluoreszenz

Bezeichnung	Bezugsquelle
Donkey-Anti-Goat IgG Cy3, 1,6 mg/ml	Dianova, Hamburg DE
Goat Anti Human Leptin Rezeptor, polyclonal, IgG, 0,5 mg/ml	AbD Serotec, Oxford, E
Goat Anti RXR $\alpha$ , polyclonal, IgG, 0,5 mg/ml	AbD Serotec, Oxford, E

M30 CytoDEATH™ Klon M30 (Mouse IgG2b), 0,05 mg/ml	Alexis, San Diego, USA
Rabbit-Anti-Mouse IgG Cy2, 1,6 mg/ml	Dianova, Hamburg, DE

## 2.6 Zellen

Bezeichnung	Bezugsquelle
BeWo	European Collection of Cell Cultures (ECACC), Salisbury, E
HVT	ScienCell, Carlsbad, USA
JEG-3	ATCC, Washington, USA
MCF-7	European Collection of Cell Cultures (ECACC), Salisbury, E

## 2.7 Gewebe

Bezeichnung	Bezugsquelle
Paraffinschnitte von Abortplazenten	Archiv der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Klinikum der Universität München – Campus Innenstadt, München, DE
Gefrierschnitte von Interruptio-Plazenten nach § 218/219 StGB  Bewilligt durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München Projektnummer: 337-06	Gynäkologische Praxis, München, DE

## 2.8 Software

Bezeichnung	Bezugsquelle
ABI PRISM 7500 Fast	Applied Biosystems, Foster City, USA
Axio Vision, V.4.5	Carl Zeiss, Oberkochen, DE
Bio-Rad Quantity One® Software	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA

Bio-Rad Universal Hood II	Bio-Rad Laboratories, Mailing, I
Gimp® Bildbearbeitungsprogramm	GIMP (GNU Image Program): Freies Bildbearbeitungs-programm unter der GNU General Public License (GPL), Gimp® Developer Team
SPSS für Windows, Social Sciences Computer Software Version V.15.01	SPSS, Chicago, USA

## 2.9 Reagenzien, Lösungen und Zubehör für dedizierte Versuche

### 2.9.1 Immunzytochemie

Bezeichnung	Bezugsquelle
Eindeckmedium Aquatex®	Merck, Darmstadt, DE
Hämalaun	Apothekenbedarf der LMU, München, DE
Substrat Chromogen 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) plus	Dako, Glostrup, Dänemark
Vectastain Elite ABC-Kit mouse IgG	Vector Laboratories, Burlingame, USA

### 2.9.2 Gelelektrophorese für Western Blot

Bezeichnung	Bezugsquelle
Blotpuffer (Tris/Glycine Puffer)	Bio-Rad, München, DE
Laufpuffer (Tris/Glycine/SDS Puffer)	Bio-Rad, München, DE
Mini-PROTEAN 3 System Bestandteile	Bio-Rad, München, DE
Polyvinylidene Fluoride Membran (PVDF-Membran)	Roth, Karlsruhe, DE
Precision Plus Protein Dual Color Standard	Bio-Rad, München, DE
Thick Blot Filterpapier	Bio-Rad, München, DE

### 2.9.3 RNA-Extraktion, Reverse Transkription, Quantitative Real-time PCR

Bezeichnung	Bezugsquelle
<b>RNA Extraktion</b>	
Membran Desalting Buffer (MDB)	Macherey-Nagel, Düren, DE
NucleoSpin® RNAII Kit	Macherey-Nagel, Düren, DE
RA1, RA2, RA3 Buffer	Macherey-Nagel, Düren, DE
rDNase	Macherey-Nagel, Düren, DE
Reaction Buffer für rDNase	Macherey-Nagel, Düren, DE
RNAse freies Wasser	Macherey-Nagel, Düren, DE
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt, DE
<b>Reverse Transkription</b>	
10x RT Buffer	Applied Biosystems, Foster City, USA
25x dNTP Mix	Applied Biosystems, Foster City, USA
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
MultiScribe™ Reverse Transkriptase	Applied Biosystems, Foster City, USA
Nuclease-freies Wasser	Applied Biosystems, Foster City, USA
Oligo-dT Primer	Applied Biosystems, Foster City, USA
RNAse Inhibitor	Applied Biosystems, Foster City, USA
<b>TaqMan®-PCR</b>	
Nuclease-freies Wasser	Applied Biosystems, Foster City, USA
TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix 2x	Applied Biosystems, Foster City, USA

### 2.9.4 Primer

Bezeichnung	Bezugsquelle
GAPDH (Hs99999905_m1)	Applied Biosystems, Foster City, USA
ObR (Hs00174492_ml) (exon boundary 19-20)	Applied Biosystems, Foster City, USA



RXR $\alpha$ (Hs00172565_m1)	Applied Biosystems, Foster City, USA
$\beta$ -ACT (Hs99999903_m1)	Applied Biosystems, Foster City, USA

### 2.9.5 Bradford Assay

Bezeichnung	Bezugsquelle
Bradford-Reagenz, Protein Assay Farbstoff-Konzentrat	Bio-Rad, München, DE
Bradford-Standard, Protein Assay Standard II	Bio-Rad, München, DE
Küvette (Halb-Mikro-Küvette 10x4x45 mm)	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Zelllysepuffer zusammengesetzt aus: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Lysis Buffer 10 (aus dem Surveyor<sup>TM</sup>IC - Human Total <math>\beta</math>-Catenin Immonoassay)</li> <li>- Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)</li> <li>- Protease-Inhibitor-Cocktail</li> </ul>	R&D Systems, Minneapolis, USA  Sigma Aldrich, St. Louis, USA  Sigma Aldrich, St. Louis, USA

### 2.9.6 Dotblot und Western Blot

Bezeichnung	Bezugsquelle
BCIP/NBT Chromogen-Substrat-Lösung	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Casein Lösung	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Lysepuffer (Protease Inhibitor Cocktail + Radioimmunoprecipitation Assay Puffer)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, DE
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Na-Azid	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Nitrocellulose Membran	Bio-Rad, München, DE
TBS-Stammlösung (60,5g Trizma-Base, Aqua dest., HCl, NaCl)	Apothekenbedarf der LMU, München, DE
Tween 20	Merck, Darmstadt, DE

Vectastain Elite ABC Kit mouse IgG	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Vectastain-ABC-AmP Maus-IgG-Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA

### 2.9.7 Doppelimmunfluoreszenz

Bezeichnung	Bezugsquelle
Eindeckmedium Vectashield Mounting Buffer with 4',6'diamno-2-phenylindole (Dapi)	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Ultra V Block	Labvision, Fremont, USA
Verdünnungsmedium S322	Dako, Glostrup, DK

### 3 Methoden

Um den Einfluss der Substanzen 9-*cis*RA, ATRA und 15d-J<sub>2</sub> auf die RXR $\alpha$  Expression in Chorionkarzinomzellen und HVT zu analysieren, wurden die Immunzytochemie, der Western Blot und die Real-time Polymerasekettenreaktion (TaqMan®-PCR) angewandt. Die Untersuchung des Einflusses der Substanzen auf die ObR Expression wurde mittels Immunzytochemie, Dot Blot und TaqMan®-PCR durchgeführt. Die Doppelimmunfluoreszenz wurde zur Detektion der beiden untersuchten Rezeptoren, RXR $\alpha$  und ObR, mit dem Apoptosemarker M30 in Abortplazenten eingesetzt.

#### 3.1 Zellkultur

##### 3.1.1 Voraussetzungen

Für die *in vitro* Analyse wurden die Chorionkarzinomzellen BeWo (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK) und JEG-3 (ATCC, Washington, USA) und humane villöse Trophoblasten (HVT) (ScienCell, Carlsbad, USA) verwendet. Die Zellen wurden in Dulbecco's modifiziertem Eagle Nährmedium (DMEM), das mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) versetzt war, in T75 (75 cm<sup>2</sup>) Flaschen kultiviert. Bei einer Temperatur von 37°C und einer atmosphärischen CO<sub>2</sub> Konzentration von 5% wurden die Zellen in T75 Flaschen im Brutschrank aufbewahrt. Zur Verhinderung von Kontaminationen der Zellen wurden die Versuche unter sterilen Bedingungen an einer Sterilwerkbank (Uniequip, Planegg, Deutschland) und mit sterilen Geräten und Materialien durchgeführt.

##### 3.1.2 Zellkultivierung von BeWo und JEG-3 Zellen

Einmal pro Woche wurde das (DMEM) Medium der Zellen abgezogen und 12 ml frisches Medium hinzugefügt. Innerhalb von 7 Tagen Inkubation erreichten die Chorionkarzinomzellen meist ein konfluentes Wachstum (Monolayer) in den Flaschen. Es folgte die Zellpassagierung, um das Absterben von Zellen zu verhindern. Zunächst wurde das verbrauchte Medium abgezogen und verworfen. Die Flaschen wurden mit PBS gespült, um das restliche Medium inklusive FCS auszuwaschen. Im Anschluss wurden 2 ml Trypsin/EDTA hinzugefügt. Daraufhin wurden die Flaschen für 8 min. bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Inkubation mit Trypsin diente der Ablösung der Zellen vom Flaschenboden und der Trennung der Zellen untereinander. Durch Zugabe von 8 ml Medium wurde die Wirkung von Trypsin beendet. Nach gründlichem Mischen der Zellen wurden ca. 100  $\mu$ l der Suspension zur Zellzählung in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Die restliche Zellsuspension wurde für 5 min. bei 1000 Upm zentrifugiert. Das nach der Zentrifugation entstandene Zellpellet wurde zu einer

Konzentration von 1 Millionen Zellen / 1 ml frischem Medium gemischt und zurück in die T75 Flasche pipettiert.

### **3.1.3 Zellkultivierung von HVT-Zellen**

Humane villöse Trophoblasten (HVT) sind Zytotrophoblasten. Sie sind Primärkulturen, die kryokonserviert geliefert werden. Da sie eine begrenzte Teilungsfähigkeit besitzen, wurden sie direkt nach dem Auftauen (1 Millionen Zellen/ Kryoröhrchen) und Aussäen für die Stimulationsversuche herangezogen.

### **3.1.4 Einfrieren von Zellen**

BeWo und JEG-3 Zellen wurden bei niedriger Passagierzahl (maximal Passagennummer 30) eingefroren. Zu Beginn des Versuches wurde das portionierte Einfriermedium bei 4°C im Kühlschrank aufgetaut. Dieses enthält die kryoprotektive Substanz DMSO, die Einfrierschäden durch Kristallbildung verhindern kann. Jedoch ist DMSO bei Wärme zytotoxisch und somit musste der Einfriervorgang zügig auf Eis erfolgen. Es folgten die Trypsinierung und Zellzählung. Das Falcon mit der Zelllösung wurde im Anschluss abzentrifugiert, das überstehende Medium abpipettiert und das Zellpellet mit 10 ml PBS gewaschen. Daraufhin fand eine erneute Zentrifugation für 5 min. bei 1000 Upm statt. Das abzentrifugierte Falcon wurde auf Eis gestellt, das überstehende Medium abgezogen und mit Kryomedium eine Zellsuspension mit der Konzentration von 5 Millionen Zellen pro 1 ml erstellt. Je 1 ml der Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen abgefüllt. Diese Schritte fanden auf Eis statt. Zur schrittweisen Akklimatisierung wurden die Kryoröhrchen in Einfrierboxen bei -80°C im Gefrierschrank über Nacht gelagert. Im Anschluss fand die Lagerung im Stickstofftank statt.

### **3.1.5 Aussaat von eingefrorenen Zellen**

Das Wasserbad wurde auf 37°C geheizt. Die Kryoröhrchen wurden aus dem Stickstofftank entnommen, mit 70% Ethanol steril abgewischt und im Wasserbad aufgetaut. Nachdem die Zellen aufgetaut waren, wurden sie in der Sterilwerkbank aus dem Kryoröhrchen in ein Falcon überführt und mit 5 ml vorgewärmten Medium vermischt. Das Medium neutralisiert DMSO. Es folgte eine 5 minütige Zentrifugation bei 1000 Upm. Das Medium im Überstand wurde daraufhin abgezogen. Auf das Zellpellet wurden 12 ml frisches Medium pipettiert und die vermischte Suspension in eine T75 Zellkulturflasche überführt.

### 3.1.6 Bestimmung der Zellzahl

Von den aus der Zellsuspension entnommenen 100  $\mu$ l (siehe 3.1.2) wurden 25  $\mu$ l mit 50  $\mu$ l PBS und 25  $\mu$ l Trypanblau vermischt. Teil der Mischung wurde auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Die Zellzählung erfolgte mit Hilfe eines Diaplan Lichtmikroskops (Leitz, Wetzlar, Deutschland). Nicht vitale Zellen wurden durch ihre blaue Farbe Trypanblau identifiziert, die die Membran von toten Zellen durchdringt. Lediglich vitale Zellen wurden auf vier Quadraten der Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Gesamtzellzahl berechnete sich folgendermaßen:

Die Summe der ausgezählten Zellen wurde mit einem Verdünnungsfaktor von 10, das 10 ml der Suspension im Falcon nach Trypsinieren entspricht, und  $10^4$ , das sich aus den Maßen der Neubauer-Zählkammer ergibt, multipliziert. Die Summe ergab die endgültige Zellzahl (in Mio. Zellen), die 10 ml der Zellsuspension beinhalten.

## 3.2 Detektion der Rezeptoren RXR $\alpha$ und ObR auf Proteinebene

### 3.2.1 Immunzytochemie zum Nachweis von RXR $\alpha$ und ObR

#### 3.2.1.1 Stimulation von BeWo, JEG-3 und HVT Zellen

Als Substanzen wurden die Retinoide 9-*cis*-Retinsäure (9-*cis*RA), all-*trans*-Retinsäure (ATRA) und der PPAR $\gamma$  Agonist 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J<sub>2</sub> (15d-J<sub>2</sub>) verwendet.

BeWo und JEG-3 Zellen wurden in 8-Well Chamberslides bei einer Densität von 40.000 Zellen/500  $\mu$ l Medium ausgesät. Sobald sie konfluent gewachsen waren, was nach ca. 24h der Fall war, wurde das Medium der Wells abgezogen. 500  $\mu$ l frisches Medium vermischt mit 1 nmol/ml bzw. 10 nmol/ml 9-*cis*RA, ATRA oder 15d-J<sub>2</sub> wurden in die Wellplatten hinzugefügt. Unstimulierte Zellen, in denen ebenfalls Mediumwechsel erfolgte, wurden als Kontrolle mitgeführt. Die Zellen wurden für 24h bzw. 48h in den Chamberslides im Brutschrank inkubiert. Für die immunzytochemische Analyse der ObR Expression (3.2.1.2) wurden die BeWo und JEG-3 Zellen mit 10 nmol/ml 9-*cis*RA und 15d-J<sub>2</sub> stimuliert.

Die Zytotrophoblasten HVT wurden bei einer Zellzahl von 150.000 Zellen/500  $\mu$ l auf die Chamberslides ausgesät. Nachdem sie ein konfluentes Wachstum erreichten, wurde das Medium abgezogen. Als nächsten Schritt wurden 500  $\mu$ l der jeweiligen 10 nmol/ml Suspensionen der Stimulanzen 9-*cis*RA, ATRA und 15d-J<sub>2</sub> in Medium verdünnt in die Wells pipettiert und für 72h im Brutschrank inkubiert.

Pro Zelllinie wurden 6 voneinander unabhängige Stimulationsversuche für die jeweilige Konzentration (Kontrolle, 1 nmol/ml, 10 nmol/ml) und die jeweilige Inkubationszeit (24h, 48h, 72h) durchgeführt.

Da Retinoide lichtsensibel sind, erfolgten das Ansetzen der Substanzen und die Zellstimulation im abgedunkelten Raum, um eine Fotodegradation zu verhindern. Zudem wurden für die Retinoide amberfarbene 1,5 ml Reaktionsgefäße (Brand, Wertheim, Deutschland), zum Schutz vor UV-Licht, verwendet.

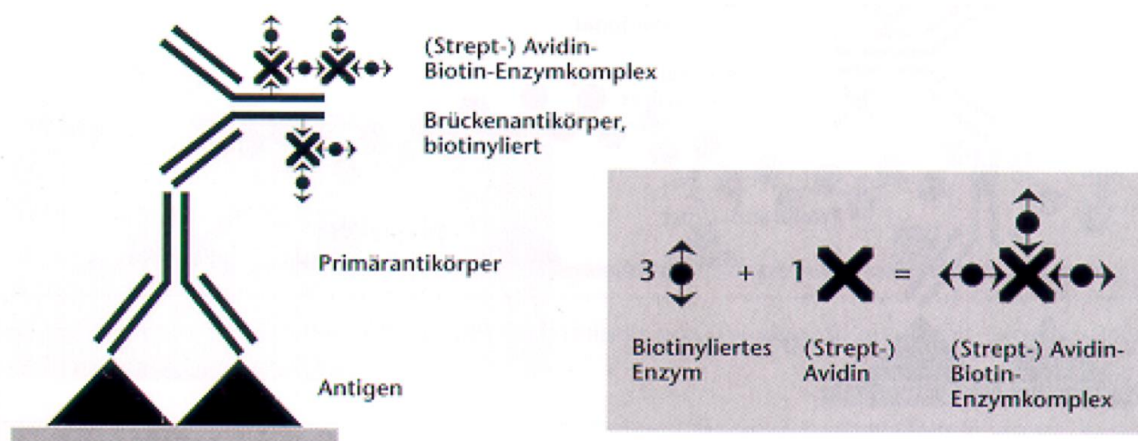
Der zytotoxische Effekt von Ethanol oder Dimethyl Sulfoxid (DMSO) auf die Zellüberlebensfähigkeit in Zelllinien wie BeWo Zellen wurde in der Literatur beschrieben [196]. Nachdem die Retinoide 9-*cis*RA und ATRA vor Zellstimulation mit DMSO oder Ethanol, unter Einhaltung einer 3‰ Grenze für DMSO bzw. Ethanol, gelöst wurden, konnte eine morphologische Veränderung und eine beeinträchtigte Anfärbung der BeWo und JEG-3 Zellen beobachtet werden. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung stellte sich eine veränderte Expression der nicht-steroidalen Kernrezeptoren beeinflusst durch DMSO und Ethanol heraus [197]. Da DMSO und Ethanol die Expression von RXR $\alpha$  beeinträchtigten, wurden sie nicht zur Dissolvierung der Retinoide herangezogen. Alternativ wurden die Retinoide in DMEM Medium gelöst.

Die im Primärfokus stehenden Experimente wurden mit den Chorionkarzinomzellen BeWo, JEG-3 und den Primärkulturen HVT durchgeführt. Alle drei Zelllinien wiesen übereinstimmende Ergebnisse auf. Somit repräsentieren die Chorionkarzinomzellen ein geeignetes Trophoblastzellen- bzw. HVT-Modell. Die Hauptexperimente der BeWo und JEG-3 Zellen wurden konstant mit den Ergebnissen der mit HVT durchgeführten Versuche überprüft. HVT Zellen wurden mit den Substanzen für 72h, anstatt wie die Chorionkarzinomzellen für 24h und 48h inkubiert, weil für HVT ein langsames Wachstumsverhalten charakteristisch ist und sie sich später differenzieren.

### **3.2.1.2 Immunzytochemische Analyse von RXR $\alpha$ und ObR**

Die Immunzytochemie diente zur Analyse der RXR $\alpha$  bzw. ObR Expression der stimulierten im Vergleich zu den unstimulierten BeWo, JEG-3 und HVT-Zellen. Sie beruht auf der Detektion des Antigens anhand des Avidin-Biotin-Komplexes (ABC-Methode). Als Enzym wird die Peroxidase verwendet. Das Prinzip der ABC-Methode beschreibt die Affinität von Avidin zu dem hydrophilen Vitamin Biotin. Avidin ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 68 kDa, das aus Hühnereiweiß gewonnen wird. Es ist ein Tetramer und besitzt Bindungsstellen für Biotin. Da unspezifische Reaktionen bei der Anwendung von Avidin auftreten können, wird alternativ das reinere Streptavidin verwendet. Dieses entstammt dem Bakterium „*Streptomyces avidinii*“ und wird gentechnologisch gewonnen. Biotin und die Peroxidase binden an die Bindungsstellen von Streptavidin, woraus der ABC-Komplex entsteht. Der Primärantikörper, in dieser Arbeit der Anti-humane RXR $\alpha$  Maus monoklonale IgG2a Antikörper (Anti-RXR $\alpha$ ) bzw. der Anti-humane Leptin Rezeptor Maus IgG2B monoklonale Antikörper (Anti-ObR), bindet über den Brückenantikörper

bzw. den Sekundärantikörper, der biotinyliert (mit Biotin markiert) ist, an den ABC-Komplex.



**Abbildung 6: Die Avidin-Biotin-Methode [198]** Der Primärantikörper bindet an das nachzuweisende Antigen und über einen Brückenantikörper bindet er an den ABC-Komplex. Dieser besteht aus Streptavidin, Biotin und der Peroxidase.

Nach Zugabe des Chromogens 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC) initiiert die Peroxidase eine enzymatische Reaktion, die sich durch einen rot-braunen Farbumschlag äußert.

Die Schritte der immunzytochemischen Analyse der Antigene RXR $\alpha$  und ObR waren bis auf die Verwendung eines unterschiedlichen Primärantikörpers und dessen unterschiedlicher Verdünnung (Anti-RXR $\alpha$ : 5  $\mu$ g/ml; Anti-ObR: 8,3  $\mu$ g/ml) identisch und werden aus diesem Grund in demselben Methodenabschnitt erläutert. Pro Rezeptor, RXR $\alpha$  bzw. ObR, wurden 6 voneinander unabhängige immunzytochemische Analysen durchgeführt.

Nach einer Inkubation der Zellen mit den Substanzen für 24h bzw. 48h wurden die Zellen in einer 1:1 Lösung Ethanol absolut/Methanol absolut für 15 min. auf den Chamberslides fixiert. Nachdem sie getrocknet waren, wurden sie für 5 min. in PBS gewaschen. Die darauffolgenden Inkubationsschritte erfolgten in einer Feuchtkammer, um das Austrocknen der Zellen auf den Chamberslides zu verhindern. Wenn nicht anders erwähnt, erfolgten die Versuche bei Raumtemperatur. Die Schnitte wurden für 20 min. mit Pferd Blockierungsserum aus dem Vectastain-ABC-Elite Kit für die Mausspezies (Vector Laboratories, Burlingame, USA) inkubiert. Das Blockierungsserum sättigt elektrostatische Ladungen im Gewebe ab. Es stammt aus der Tierspezies, in der der sekundäre Antikörper generiert wurde, und blockiert unspezifische Bindungsstellen, um eine unspezifische Anfärbung zu verhindern. Das Blockierungsserum wurde nach 20 min. abgekippt. Es wurden jeweils 70  $\mu$ l des Anti-humanen RXR $\alpha$  Maus monoklonalen IgG2a Antikörpers (Anti-RXR $\alpha$ ) (5  $\mu$ g/ml) bzw. des Anti-humanen Leptin Rezeptor Maus IgG2B monoklonalen Antikörpers (Anti-ObR) (8,3  $\mu$ g/ml) pro Well aufgetragen. Die mit den Primärantikörpern beschichteten Chamberslides wurden in der Feuchtkammer für 17 h bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation von 17 h wurden die Chamberslides 2 mal 2 min. in PBS gewaschen. Es

folgte die Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper des Vectastain-ABC-Elite Kits, der aus Pferd Normalserum, Anti-Maus IgG und 10 ml PBS zusammengesetzt ist. Daraufhin wurden die Chamberslides erneut 2 mal 2 min. gewaschen und für 30 min. mit dem ABC-Komplex des Vectastain-ABC-Elite Kits bestückt. Nach einem weiteren Waschgang von 2 mal 2 min. in PBS erfolgte die Inkubation der Chamberslides mit 3-Amino-9-Ethylcarbazol plus (AEC plus). Die Chamberslides, auf die der Primärantikörper Anti-RXR $\alpha$  aufgetragen wurde, wurden für 4 min. mit AEC plus und die Chamberslides mit dem Primärantikörper Anti-ObR wurden für 10 min. mit AEC plus inkubiert. Der Farbumschlag wurde unter dem Lichtmikroskop beobachtet, um eine Überfärbung der Zellen zu verhindern und eine optimale Anfärbung der Zellen zu gewährleisten. Nach Spülung der Chamberslides in Aqua dest. wurden sie für 30 sek. mit saurem Hämalaun nach Mayer gegengefärbt. Dies ist ein in saurer Lösung versetzter Farbstofflack, der einen pH-Wert von 4,5 besitzt. Der positiv geladene basische Farbstoff lagert sich an die Phosphatgruppe der DANN im Kern, die negativ geladen ist, an. Die Kerne werden auf Grund ihrer negativen Ladung bei einem sauren pH-Wert am stärksten angefärbt. Das Plasma wird zartblau angefärbt. Um restliche Säurereste auszuwaschen, wurden die Chamberslides für 4 min. in fließendem Leitungswasser gewässert. Anschließend wurden die Chamberslides in Aqua dest. gespült und mit dem wässrigen Eindeckmedium Aquatex® eingedeckt. Die Färbung wird durch das Eindecken nicht beeinträchtigt, da Aquatex® den gleichen Brechungsindex wie Glas besitzt.

Positiv- sowie Negativkontrollen liefen parallel zu den immunzytochemischen Versuchen mit. Als Positivkontrolle zum Nachweis der Antigene RXR $\alpha$  und ObR wurde die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 verwendet, da diese beide Rezeptoren exprimiert. MCF-7 Zellen wurden mit den Primärantikörpern Anti-RXR $\alpha$  (5  $\mu$ g/ml) bzw. Anti-ObR (8,3  $\mu$ g/ml) inkubiert. Eine Positivität dieser Kontrolle stellt sicher, dass die Färbung spezifisch ist.

Als Negativkontrolle von RXR $\alpha$  und ObR wurden MCF-7 Zellen, BeWo und JEG-3 mit einem Maus IgG der jeweiligen Maus IgG Isotypen-Kontrolle inkubiert. Die Isotypen-Kontrolle stellt sicher, dass Spezies des Antikörpers keine unspezifische Anfärbung provoziert. Die Konzentration der Maus IgG Isotypen Kontrolle wurde den Endkonzentrationen von Anti-RXR $\alpha$  (5  $\mu$ g/ml) und Anti-ObR (8,3  $\mu$ g/ml) angeglichen.

### **3.2.1.3 Immunzytochemische Auswertung**

Die Expression der Rezeptoren RXR $\alpha$  und ObR in BeWo, JEG-3 und HVT-Zellen wurde immunzytochemisch mit Hilfe eines Leitz Diaplan Lichtmikroskops beurteilt. Die abgebildeten Aufnahmen wurden mit einem digitalen Kamerasystem (JVC, Victor Company of Japan) an unterschiedlichen Stellen der Chamberslides aufgenommen.



Ein Überblick wurde bei einer 6.8-fachen Vergrößerung (x6.8) gewonnen und die Auswertung erfolgte bei einer Vergrößerung von x10 und x25. Pro Versuchsansatz (insgesamt 6) und pro Substanz wurden 8 Felder von zwei voneinander unabhängigen Personen ausgewertet. Ein Kontrollfeld mit unbehandelten Zellen wurde pro Substanz mitgefärbt. Die Anfärbung der Kontrollen der gleichen Zelllinien und Inkubationszeiten wurde zusammengefasst und als Gesamtkontrolle mit den zugehörigen stimulierten Zellen verglichen.

Die Beurteilung der Intensitätsanfärbung der RXR $\alpha$ - und ObR-exprimierenden Zellen bestand aus folgenden Kategorien:

- Negativ (keine Anfärbung)
- Schwach (1-fache Anfärbung)
- Mäßig (2-fache Anfärbung)
- Stark (3-fache Anfärbung)

Pro Gesichtsfeld wurde die Menge der drei möglichen Anfärbungsintensitäten der Zellen in Prozent (%) angegeben. Der Mittelwert (%) der mäßig- bis stark angefärbten Zellen der behandelten und unstimulierten Zellen wurde pro Gesichtsfeld ermittelt und verglichen. Als Fehlerindikator wurde die Standardabweichung verwendet, die die Streuung der Werte um den Mittelwert anzeigt. Die Standardabweichungen sind als vertikale Balken in den folgenden Diagrammen (Kapitel 4 Ergebnisse) dargestellt.

Immunzytochemisch wird RXR $\alpha$  als kernständiger Rezeptor und ObR als membranständiger Rezeptor exprimiert. ObR besitzt eine extrazelluläre, eine intrazelluläre und eine Transmembrandomäne.

Für die Auswertung der Anfärbungsintensität der HVT wurde als Auswertungskriterium der prozentuale Anteil der 1-fach positiv angefärbten Zellen herangezogen.

### **3.2.2 Dot Blot zum Nachweis von ObR**

#### **3.2.2.1 Zellstimulierung und Gewinnung des Zelllysats für die Durchführung des Bradford-Assays**

Im Anschluss an die Zellpassagierung (3.1.2) wurden jeweils 200.000 BeWo bzw. JEG-3 Zellen pro 1 ml Medium pro Well in 24-Well Platten ausgesät und für 24h im Brutschrank inkubiert. Daraufhin wurde das Medium abgezogen und durch 1 ml frisches Medium ersetzt, das jeweils mit 10 nmol/ml 9-*cis*RA oder 15d-J<sub>2</sub> vermischt war. Aufgrund der Verwendung der lichtempfindlichen 9-*cis*RA fand die Zellstimulation im abgedunkelten Raum statt und als Reaktionsgefäße wurden 1,5 ml amberfarbene Reaktionsgefäße verwendet. In den übrigen Wells, die als Kontrollen dienten, wurde

lediglich Medium gewechselt. Nach einer Inkubationszeit von 24h wurden die Zellen mit einem Zellscriber vom Plattenboden gelöst, das Medium mit den gelösten Zellen abgezogen und in Falcon Tubes überführt. Es folgte eine Zentrifugation der Zellen für 5 min. bei 1000 Upm. Das Medium über dem entstandenen Zellpellet wurde anschließend abgezogen und 10 ml steriles PBS auf das Zellpellet pipettiert. Erneut wurden die Zellen für 5 min. bei 1000 Upm zentrifugiert. Das PBS über dem Zellpellet wurde wieder abgezogen und durch 10 ml frisches PBS ersetzt. Nach der Zentrifugation und dem Abziehen des PBS-Überstandes wurde das Zellpellet mit 300 µl des fertiggestellten Lyse-Puffers gemischt, woraus das Zelllysate entstand. Der Zelllyse-Puffer besteht aus dem Lysis Buffer 10, der dem Surveyor™ IC – Human Total  $\beta$ -Catenin Immunoassay Kit entstammt, einem Protease Inhibitor Cocktail und Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF). Nach einer 1:1 Mischung des Lysis Buffers 10 mit dem Protease Inhibitor Cocktail wurden 100 µM PMSF hinzugefügt. PMSF wurde bei einer Masse von 174 mg zuvor in 10 ml Ethanol aufgelöst. Aus dieser Lösung wurden 10 µl der PMSF-Lösung für 10 ml des Lysis Buffers 10 verwendet.

Während des Ansetzens des Bradford-Assays (siehe 3.2.2.2) wurde das Zelllysate für 15 min. auf Eis gelagert. Es folgte eine finale Zentrifugation des Zelllysats für 5 min. bei 2000 Upm. Für die Proteinbestimmung im Bradford-Test wurden 20 µl des Zelllysateüberstandes verwendet. Der restliche Zelllyse-Puffer wurde bei -20°C eingefroren und anschließend für die Verdünnung der Proben im Dot Blot eingesetzt.

### 3.2.2.2 Gesamtproteinbestimmung nach Bradford

Der Bradford-Assay bestimmt die quantitative Gesamtproteinmenge von Proben anhand eines Spektralphotometers.

Zu Beginn des Bradfordtests wurde die Bradfordreagenz-Stammlösung 1:5 mit Aqua dest. verdünnt (=Gebrauchslösung). Die gewonnenen Proben aus 3.2.2.1 wurden ebenfalls mit Aqua dest in einem 1:2 Verdünnungsverhältnis angesetzt. Für die Untersuchung wurden die mit 10 nmol/ml 9-*cis*RA bzw. 10 nmol/ml 15d-J<sub>2</sub> inkubierten und die unbehandelten BeWo und JEG-3 herangezogen.

Zur Kalibrierung wurde der Bradford-Standard (Konzentration 1,48 mg/ml) nach folgendem Schema verdünnt, um eine Standardkurve zu erhalten:

- 1000 µg/ml = 676 µl Standard (unverdünnt) + 324 µl Aqua dest.
- 800 µg/ml = 400µl Standardlösung (aus der 1000 µg/ml Verdünnung) + 100 µl Aqua dest.
- 400 µg/ml = 200µl Standardlösung (aus der 800 µg/ml Verdünnung) + 200 µl Aqua dest.

- 200 µg/ml = 200µl Standardlösung (aus der 400 µg/ml Verdünnung) + 200 µl Aqua dest.
- 100 µg/ml = 200µl Standardlösung (aus der 200 µg/ml Verdünnung) + 200 µl Aqua dest.
- 50 µg/ml = 200µl Standardlösung (aus der 100 µg/ml Verdünnung) + 100 µl Aqua dest.

Der Nullwert entstand aus der Mischung von 1 ml Bradfordreagenz-Gebrauchslösung mit 20 µl Aqua dest. Für die Standardansätze wurden jeweils 20 µl der entsprechenden Standards der Verdünnungsreihe mit 1 ml Bradfordreagenz-Gebrauchslösung gemischt. Von den Proben der stimulierten und unstimulierten Zellen (1:2 in Aqua dest. verdünnt) wurden 20 µl jeder Probe entnommen und mit 1 ml verdünntem Bradfordreagenz vermischt. 1 ml jedes angesetzten Röhrchens der Standardansätze, der Proben und des Nullwertes wurde in jeweils eine Küvette überführt.

Ein Spektralphotometer, das die Messung bei einer Wellenlänge von 595 nm und bei linearer Regression durchführt, wurde zur Gesamtproteinbestimmung herangezogen. Vorerst wurden der Nullwert und die Standardkurve der 6 Standards bestimmt. Daraufhin konnte das Photometer die Proteinmenge der stimulierten Zellen und Kontrollen errechnen.

### 3.2.2.3 Berechnung der einzusetzenden Probenvolumina für den Dot Blot

Anhand der Bestimmung der Gesamtproteinmenge der Proben im Bradford konnten die im Dot Blot einzusetzenden Volumina der Proben errechnet werden, sodass nach Angleichung der Proteinkonzentrationen, die Proben im Dot Blot miteinander verglichen werden konnten. Da die Proben zu Beginn 1:2 in Aqua dest. verdünnt wurden, folgte eine Multiplikation der mittels Spektralphotometer erhaltenen Proteinkonzentrationen (mg/ml) mit einem Faktor von 2, um die Ausgangskonzentrationen zu erhalten.

Alle Proben wurden mit Zelllysepuffer auf die Proteinkonzentration der Probe mit dem niedrigsten Proteingehalt verdünnt. Die jeweils benötigte Menge an Zelllysate wurde folgendermaßen berechnet:

$$x \text{ (}\mu\text{l) des Zelllysats} = \frac{\text{Proteinmasse (mg) der Probe mit geringster Proteinkonzentration} \times 1000 \mu\text{l}}{\text{Proteinmasse (mg) des Zelllysates}}$$

Das errechnete Volumen der jeweils zu verdünnenden Probe (µl) wurde mit Zelllyse-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 1000 µl aufgefüllt.

### 3.2.2.4 Detektion des Leptin Rezeptors im Dot Blot

Das Prinzip des Dot Blots entspricht der ABC-Methode der Immunzytochemie (siehe 3.2.1.2). Als Enzym wird jedoch anstatt der Peroxidase die Alkalische Phosphatase verwendet. Von der mit Zelllyse-Puffer verdünnten Probe wurden pro Probe jeweils 3 µl auf eine Nitrocellulose Membran mit einer Pipette aufgetragen. Um sicher zu gehen, dass die Ergebnisse nicht durch Artefakte verfälscht werden, wurden 4 Dots pro Probe aufgetragen. Nachdem die Dots nach ca. 20 min. vollständig getrocknet waren, wurde die Membran mit einer Lösung, bestehend aus 5% Milchpulver in TBS, 1% Tween 20 und 0,01% Na-Azid, für 17h bei 4°C blockiert, um eine unspezifische Anfärbung zu verhindern. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran aus der Lösung entnommen und mit dem Anti-humanen Leptin Rezeptor Maus IgG2B monoklonalen Antikörper (0,083 µg/ml), welcher in 5% Milchpulver in TBS, 1% Tween 20 und 0,01% Na-Azid verdünnt wurde, vollständig bedeckt. Die Inkubation fand für 1 h bei Raumtemperatur statt. Im Anschluss wurde die Membran 1 mal 15 min. und erneut 3 mal 5 min. in TBS gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem Anti-Maus Sekundärantikörper (10 ml Milchpulver + 1 ggt. Anti-Maus) für 1 h bei Raumtemperatur. Ein weiterer Waschvorgang der Membran für 3 mal 5 min. in TBS fand statt, gefolgt von einer 1-stündigen Inkubation mit dem Alkalische Phosphatase enthaltenden Avidin-Biotin-Komplex (10 ml TBS + 2 ggt. Lösung A + 2 ggt. Lösung B) bei Raumtemperatur. Daraufhin wurde die Membran erneut 3 mal 5 min. in TBS gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit dem Farbstoffsubstrat BCIP/NBT inkubiert, bis ein violetter Farbumschlag erkennbar war. Dieser erfolgte nach 8 min. Die Färbereaktion wurde mit Aqua dest. gestoppt. Die Färbereaktion der Folgeversuche wurde jeweils nach 8 min. mit Aqua dest. beendet. Es wurden 5 Dotblot Versuche pro Zelllinie und pro Substanz durchgeführt.

### 3.2.2.5 Auswertung mit Gimp

Die Dot Blots wurden mit einem Epson Perfection Scanner (Epson, Long Beach, USA) eingescannt. Zu beachten war, dass die zu vergleichenden Dot Blots gleichzeitig eingescannt werden, um eine Helligkeitskorrektur durch den Scanner zu vermeiden.

Zur quantitativen Auswertung des Dot Blots wurde das Graphikbearbeitungsprogramm GNU Image Program (Gimp®) verwendet. Anhand eines Histogramms wertet es die relative Helligkeitsverteilung der Punkte im Dot Blot aus. Das Histogramm stellt die Verteilung der Helligkeit durch eine Grauskala dar. Schwarze Pixel werden durch den Zahlenwert 0 und weiße Pixel durch den Zahlenwert 255 kodiert.

Der Dot Blot ist in Abbildung 36 in schwarz-weiß anstatt in originalem lila dargestellt, da hierdurch der Kontrast der unterschiedlichen Anfärbungsintensitäten der Punkte besser erkennbar ist.

### 3.2.3 Western Blot zum Nachweis von RXR $\alpha$

Der Western Blot kann die RXR $\alpha$  Expression auf Proteinebene nachweisen. Die Proteine der BeWo und JEG-3 Zelllysate wurden auf einem Gel elektrophoretisch nach Ladung und Größe aufgetrennt und daraufhin auf eine PVDF Membran aufgetragen. Eine anschließende Färbung der Membran auf der entsprechenden Molekulargewichtshöhe mit dem Antikörper Anti-RXR $\alpha$  wies die Proteinexpression von RXR $\alpha$  in Form von Banden nach. Dabei ist die Farbintensität der Banden proportional zur RXR $\alpha$  Proteinkonzentration. Mittels der Bio-Rad Quantity One® Software (Hercules, USA) wurde die RXR $\alpha$  Proteinexpression quantifiziert.

#### 3.2.3.1 Stimulation und Lyse von BeWo und JEG-3 Zellen

Vor Durchführung des Western Blots wurden die BeWo und JEG-3 Zellen separat auf sterile 6-Wellplatten bei einer Dichte von 80.000 Zellen/ml Medium ausgesät. Im Anschluss an eine 24-stündige Inkubation wurde das Medium abgezogen. Es folgte eine Inkubation der Zellen für 48h mit 1 ml Medium/Well, welches 10 nmol/ml 9-*cis*RA beinhaltet. Daraufhin wurde das Medium erneut abgezogen und die Wellplatten mit PBS gewaschen. Als nächsten Schritt wurde 1 ml Lysepuffer, der aus 0,1 ml Protease Inhibitor Cocktail und 0,9 ml Radioimmunoprecipitation Assay Buffer (RIPA-Puffer) besteht, pro Well hinzugefügt. Die Inkubation betrug 15 min. auf Eis. Anschließend wurde das Lysat abgezogen und bei -20°C eingefroren.

#### 3.2.3.2 Bradford Assay zur Gesamtproteinbestimmung

Eine Proteinmenge von 10.000 ng wurde pro Probe im Western Blot eingesetzt. Die Gesamtproteinkonzentration der Probe wurde vorher mittels Bradford Assay, der in 3.2.2.2 beschrieben ist, bestimmt und das im Western Blot einzusetzende Volumen der Proben errechnet (3.2.2.3). Für die Untersuchung wurden die mit 10 nmol/ml 9-*cis*RA stimulierten und die unbehandelten JEG-3 und Zellen herangezogen.

#### 3.2.3.3 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient der Auftrennung der Proteine in Proteinbanden auf einem elektrischen Feld. Als Trägersubstanz dient dabei das Polyacrylamid-Gel. Die Proteine wurden elektrophoretisch nach Ladung und Größe aufgetrennt.

Pro Gel Well wurden 20  $\mu$ l des Probenvolumens verwendet wovon 5  $\mu$ l den Probenpuffer enthielten. Dieser setzt sich aus Mercaptoethanol und Farbreagenz zusammen und dient zur Denaturierung von Proteinen. Die angesetzten Proben wurden zunächst bei 95°C im Thermoblock für 5 min. denaturiert, danach bei 4°C im

Kühlschrank abgekühlt und anschließend zentrifugiert. Es folgte die Vorbereitung der Puffer für die Gelektrophorese:

- Lauffuffer (Tris/Glycine/SDS Puffer) = 100 ml 10x Lauffuffer + 900 ml Aqua dest.
- Blotpuffer (Tris/Glycine Puffer) = 100 ml Blotpuffer + 200 ml Methanol + 700 ml Aqua dest.

Nach Ansetzen des Blotpuffers wurde dieser auf Eis gestellt, die Kammern für die Gelektrophorese wurden vorbereitet und die Tanks mit Lauffuffer aufgefüllt. Es folgte das Bestücken der Wells mit jeweils 20 µl der Proben und jeweils 7 µl des Western Blot Protein Standards. Zunächst wurde die Blotkammer für 30 min. bei 80 W und anschließend für 1 bis 1,5 h bei 100 W an die Spannungsquelle angeschlossen. Die Gelektrophorese wurde beendet, sobald die Lauffront, die als blaue Linie angezeigt ist, an der unteren Seite des Gels angelangt war.

#### **3.2.3.4 Durchführung des Western Blots**

Im Anschluss an die Gelektrophorese erfolgte der Transfer der aufgetrennten Proteinbanden von dem Gel auf eine Polyvinylidene Fluoride Membran (PVDF-Membran).

Zunächst wurden die Filterpapiere und die Fiberpads in Blotpuffer und die PVDF-Membran in Methanol eingeweicht. Nach Vorbereitung der Gel Holder Kassette und der Blotkammer, das nach Anleitung erfolgte, wurden diese an die Stromquelle angeschlossen und für eine Dauer von 1,5 h bei 100 W laufen gelassen.

Zur Überprüfung der korrekten Durchführung des Blottens der Proteine auf die PVDF-Membran diente das Sichtbarwerden eines farbigen Standards auf der Membran. Da der Protein Standard in Milchpulver ausbleicht, wurde er von der Membran abgeschnitten. Es folgte die Blockierung der Membran in 5% Milchpulver und 1% Tween 20 für 16h bei 4°C. Im Anschluss fand die Färbung statt, die in 3.2.3.5 beschrieben ist.

#### **3.2.3.5 Detektion von RXRα im Western Blot**

Für die Färbung der Proteinbanden auf der PVDF-Membran zum Nachweis von RXRα wurde das Vectastain ABC-AmP Maus-IgG-Kit für Western Blots als Detektionssystem verwendet. Wenn nicht anders erwähnt, erfolgten die Versuchsschritte bei Raumtemperatur. Die PVDF-Membran wurde zu Beginn in Casein Lösung, die zuvor 1:10 in Aqua dest. verdünnt wurde, für 1h blockiert. Anschließend folgte die Inkubation der Membran mit dem in PBS verdünnten Anti-humanem RXRα Maus monoklonalem IgG2a Antikörper (Endkonzentration: 5 µg/ml) für 16h bei 4°C. Zwischen jedem Versuchsschritt wurde die Membran 3 mal 5 min. in Casein Lösung gewaschen. Als nächstes wurde die Membran mit dem biotinyliertem Anti-Maus IgG

Sekundärantikörper verdünnt in 10 ml Casein Lösung (Endkonzentration: 1,5 µg/ml) für 45 min. inkubiert. Nach dem Waschen der Membran wurde diese für 20 min. im Vectastain ABC-AmP Reagenz (10 ml Casein Lösung, 20 µl Lösung A, 20 µl Lösung B) inkubiert. Es folgte eine 5-minütige Waschung der Membran in 0,1 M TRIS Puffer. Die Färbung der Blotbanden erfolgte mit der BCIP/NBT-Chromogen-Substrat-Lösung für 3 min. Diese Lösung besteht aus 10 ml 0,1 M TRIS Puffer, 4 ggt. BCIP Lösung, 4 ggt. NBT Lösung und 4 ggt. Magnesium Chlorid Lösung. Die Färbereaktion wurde in Aqua dest. beendet und die Membran bei Raumluft getrocknet. Als endogene Kontrolle diente  $\beta$ -Actin ( $\beta$ ACT).

### **3.2.3.6 Auswertung des Western Blots mit der Bio-Rad Quantity One® Software**

Die Membran wurde mit der Bio-Rad Universal Hood II (Segrate, Italien) detektiert und mittels der Bio-Rad Quantity One® Software (Hercules, USA) analysiert. Die RXR $\alpha$  Proteinbandenintensitäten wurden als prozentuale Expression in Bezug auf die  $\beta$ ACT Expression, die die endogene Kontrolle darstellt, angegeben. Die Anfärbungsintensität der RXR $\alpha$  Proteinbanden bzw. die RXR $\alpha$  Expression und die  $\beta$ -Actin Expression wurden als Quotient dargestellt. Insgesamt wurden 4 Western Blots durchgeführt.

## **3.3 Detektion der Rezeptoren RXR $\alpha$ und ObR auf mRNA-Ebene**

### **3.3.1 Prinzip der quantitativen Real-time PCR (TaqMan®-PCR)**

Die quantitative Real-time PCR (TaqMan®-PCR) dient zum Nachweis der Expression der Rezeptoren auf mRNA Ebene. Die RNA-Extraktion und die Reverse Transkription sind der TaqMan®-PCR vorgeschaltet, um die gewonnene RNA in die stabilere cDNA umzuwandeln. Die cDNA wird für die TaqMan®-PCR verwendet. Vor Beginn der RNA-Extraktion erfolgte die Inkubation der Chorionkarzinomzellen mit den Substanzen.

### **3.3.2 Stimulation von BeWo und JEG-3 Zellen**

Im Anschluss an die Zellpassagierung wurden 80.000 BeWo bzw. JEG-3 Zellen/ml Medium separat in 24-Wellplatten ausgesät. Nachdem die Zellen nach 24h angewachsen waren, wurde das alte Medium abgezogen und 1 ml frisches angewärmtes Medium hinzugefügt. Dieses beinhaltete 10 nmol/ml von 9-*cis*RA bzw. 15d-J<sub>2</sub>. In den Kontroll-Wells erfolgte lediglich ein Mediumwechsel und die Zellen wurden in Abwesenheit der Substanzen inkubiert. Das Ansetzen und die Stimulierung der Zellen mit 9-*cis*RA erfolgte im abgedunkelten Raum und 9-*cis*RA wurde in amberfarbenen 1,5 µl Reaktionsgefäßen (Brand, Wertheim, Deutschland) aufbewahrt,

um eine Photodegradation zu vermeiden. Die Zelllinien wurden pro Substanz für 2h, 3h, 4h, 6h bzw. 8h in den Wellplatten im Brutschrank inkubiert. Daraufhin erfolgte die RNA Extraktion. Insgesamt erfolgten 6 voneinander unabhängige Zellstimulierungen pro Zelllinie mit anschließender RNA Isolierung.

### 3.3.3 RNA Extraktion

Die Isolierung der Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des NucleoSpin® RNAII Kits (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) durchgeführt. Nach den jeweiligen Inkubationszeiten von 2h, 3h, 4h, 6h und 8h wurde der Überstand der Wellplatten abgezogen, die Platten mit PBS gespült und 350 µl RA1 Lysis Puffer auf die Zellen pipettiert, um die angewachsenen Zellen und Zellverbände zu lösen und die Zellen zu lysieren. Das Lösen der Zellen wurde durch das Bürsten mit einem Zellscraper über den Wellplattenboden unterstützt. Das Zelllysate wurde abgezogen und pro Well in RNase-freie Reaktionsgefäße überführt. Zur weiteren Zelllyse wurden dem Zelllysate 3,5 µl β-Mercaptoethanol hinzugefügt. Anschließend wurde ein NucleoSpin-Filter in ein Sammelgefäß platziert, das Zelllysate darauf pipettiert und für 1 min. bei 11.000g zentrifugiert, um das Zelllysate zu filtern. Daraufhin wurde der NucleoSpin-Filter verworfen und das Zelllysate mit 350 µl 70%-igem Ethanol vermischt. Nachdem das Zelllysate auf die im Reaktionsgefäß befindende NucleoSpin RNA II Säule pipettiert wurde, folgte eine erneute Zentrifugation für 30 sek. bei 11.000g. Dieser Schritt diente zur Bindung der RNA an die Membran. Um die Silica Membran zu entsalzen, erfolgte die Zugabe von 350 µl Membran Desalting Buffer (MDB) auf die Säule mit einer anschließenden Zentrifugation für 1 min. bei 11.000g. Die Entsalzung erleichtert den rDNAse Verdau. Daraufhin wurde der DNAse Mix für den anschließenden DNA-Verdau in einem sterilen Reaktionsgefäß vorbereitet. Der DNAse Mix bestand pro isolierter RNA Probe aus 10 µl rekonstruierter rDNAse und 90µl Reaktionspuffer. Von dem DNAse Mix wurden 95 µl auf die Silica Membran platziert und für 15 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss erfolgten drei Waschvorgänge. Als erstes wurden 200 µl RA2 Wasch-Puffer auf die NucleoSpin® RNAII Säule pipettiert, die dann für 30 sek. bei 11.000g zentrifugiert wurde. Im Anschluss wurden 600 µl RA3 Wasch-Puffer auf die NucleoSpin® RNAII Säule, die mittlerweile in ein neues Sammelgefäß platziert wurde, pipettiert und für 30 sek. bei 11.000g zentrifugiert. Um die Silica Membran erneut zu waschen und zu trocknen, erfolgten die Zugabe von 250 µl RA3 Wasch-Puffer auf die NucleoSpin® RNAII Säule und eine 2 min. Zentrifugation bei 11.000g. Anschließend wurde die Säule in ein nucleasefreies Mikrozentrifugenröhrchen platziert. Als finalen Schritt wurden 60 µl RNase-freies Wasser auf die Säule pipettiert und für 1 min. bei 11.000g zentrifugiert. Dadurch wurde die RNA eluiert. Die Mikrozentrifugenröhrchen wurden umgehend bei -80°C eingefroren. Die Quantifizierung und Evaluation der Reinheit der gewonnenen RNA



wurde mit einem NanoPhotometer™ anhand einer photometrischen Messung bestimmt.

### 3.3.4 Reverse Transkription

In der Reversen Transkription wird die einsträngige RNA, die instabil ist, in die stabilere copyDNA (cDNA) umgewandelt. Für die Reverse Transkription wurde das High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Nach Auftauen der Kitkomponenten wurden diese für 10 sek. zentrifugiert und bis zu Versuchsbeginn im Eisblock kühl gestellt. Pro Reaktion wurden 10 µl mRNA und 10 µl des 2xRT-Mastermixes benötigt. Der 2xRT-Mastermix wurde aus folgenden Komponenten hergestellt:

Komponente	Volumen pro Probe (µl)
10x RT Buffer	2,0
25x dNTP Mix (100 mM)	0,8
Oligo-dT Primer	2,0
RNAse Inhibitor	1,0
Nuclease-freies Wasser	3,2
MultiScribe™ Reverse Transkriptase	1,0
<b>Gesamtvolumen pro Reaktion</b>	<b>10</b>

**Tabelle 4: Komponenten des 2xRT-Mastermixes**

Abhängig von der Anzahl der mRNA-Proben wurde das notwendige Gesamtvolumen des 2xRT-Mastermixes bestimmt. Pro Reaktion wurden 10 µl der mRNA und 10 µl des 2xRT-Mastermixes in ein 0,5 ml PCR Eppendorf Reaktionsgefäß pipettiert und vermischt. Die Reaktionsgefäße wurden für 10 sek. bei 11.000g zentrifugiert und in einen Eppendorf Mastercycler® Gradienten (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) platziert. Die mRNA wurde im Mastercycler für 10 min. bei 25°C, für 2 h bei 37°C, für 5 sek. bei 85°C inkubiert und abschließend bei 4°C abgekühlt. Die gewonnene cDNA wurde daraufhin bis zum Gebrauch bei -20°C eingefroren.

### 3.3.5 Quantitative Real-time PCR (TaqMan®-PCR)

Das Prinzip der quantitativen Real-time PCR (TaqMan®-PCR) beruht auf der quantitativen Bestimmung von Genen durch Vervielfältigung eines cDNA Abschnitts. Dabei wird die aus der Reversen Transkription erhaltene cDNA denaturiert und durch Anhängen von komplementären Basen zu Doppelsträngen vervielfältigt. Mittels Fluoreszenzmessung wird die Genexpression während der PCR-Amplifikation

bestimmt. Die Fluoreszenz steigt proportional mit der Zunahme der PCR-Produkte an. Die Quantifizierung erfolgt anhand eines exponentiellen Anstiegs, der durch Fluoreszenzsignale gemessen wird. Der Cycle Threshold Wert (Ct-Wert) bzw. der Schwellenwert repräsentiert den Zyklus, in dem ein signifikanter Anstieg über die Hintergrund-Fluoreszenz erstmalig auftritt.

Die TaqMan®-PCR wurde in einer 96-Well Reaktions-Mikrotiter-Platte durchgeführt. Das Reaktionsvolumen bestand pro Well aus 1 µl cDNA und 19 µl Mastermix. Als Kontrolle wurde 1 µl cDNA durch 1 µl nukleasefreies Wasser ersetzt. Der Mastermix wurde vor Beginn der Durchführung nach folgendem Schema hergestellt:

Komponente	Volumen (µl) pro Probe
TaqMan® Gene Expression Assay; 20x Konzentration (Primer)	1,0
TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix; 2x Konzentration	10,0
Nucleasefreies Wasser	8,0
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>19,0</b>

**Tabelle 5: Komponenten des Mastermixes für die TaqMan®-PCR**

Für die relative Quantifizierung der mRNA Sequenz wird eine interne Kontrolle bzw. ein Referenz-Gen (Synonym: Housekeeping-Gen) benötigt, das zur Normierung von Abweichungen der RNA-Ausgangsmenge dient. Die Normierung wird als  $\Delta Ct$ -Wert angegeben und dieser entsteht durch die Subtraktion des Ct-Wertes eines Referenz-Gens vom Ct-Wert des untersuchten Gens. Referenzgene kodieren Proteine, die von allen Zellen gleichmäßig exprimiert werden und für den Zellumsatz bedeutend sind. Nach Austesten der Referenz-Gene Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und beta-Actin ( $\beta$ ACT) wurde GAPDH als endogene Kontrolle für die weiteren Versuche eingesetzt. Es wurden folgende 4 Primer als TaqMan® Gene Expression Assay herangezogen:

Primer	Bestellnummer bei Applied Biosystems	Exon Boundary
RXR $\alpha$	Hs00172565_m1	5-6
ObR	Hs00174492_m1	19-20
GAPDH	Hs99999905_m1	3-3
$\beta$ ACT	Hs99999903_m1	1-1

**Tabelle 6: Verwendete Primer für die TaqMan®-PCR** Die Primersequenzen wurden von der Zuliefer-Firma nicht bekannt gegeben

Nachdem die Platte komplett pipettiert war, wurde eine MicroAmp® Abdeckfolie (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) zur Verhinderung von Kontaminationen

und Austrocknung auf die 96-Well Mikrotiter-Platte geklebt, diese mit einem MikroAmp® Adhesive Film Applikator auf der Platte fixiert und die Platte zur Auswertung in das 7500 ABI PRISM Fast Real-Time PCR Gerät platziert. Das PCR-Gerät führte die PCR-Amplifikation unter folgenden thermischen Bedingungen durch: Zu Beginn bei 95°C für 20 sek., 40 Amplifikationszyklen bei 95°C für 3 sek. und 30 sek. bei 60°C.

### **3.3.6 Auswertung der Real-time PCR (TaqMan®-PCR)**

Die Genexpression von RXRα und ObR wird durch die x-fache Expression mit Hilfe des  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Wertes angegeben. Der  $\Delta Ct$  Wert errechnet sich, indem der CT Wert der endogenen Kontrolle vom CT Wertes des Zielgens subtrahiert wird. Den  $\Delta\Delta Ct$  Wert erhält man daraufhin aus der Subtraktion des  $\Delta Ct$  Wert des Kalibrators von dem  $\Delta Ct$ -Wert der Probe.

### **3.4 Statistische Auswertung der Immunzytochemie, des Dot Blots, des Western Blots und der TaqMan®-PCR**

Das SPSS/PC Software Paket (Version 15.1) (SPSS, Social Sciences Computer Software Version, Chicago, USA) wurde für die Sammlung, Prozessierung, statistische Auswertung und Analyse der Daten verwendet. Der Wilcoxon-signed-rank Test wurde zur statistischen Analyse herangezogen. Als statistisch signifikant wurden P-Werte, mit  $p < 0.05$ , erachtet.

### **3.5 Doppelimmunfluoreszenz**

Ziel der Doppelimmunfluoreszenzfärbung war, die Expression der Antigene RXRα und M30 CytoDEATH™ (M30) bzw. ObR und M30 in Abortplazenten und in künstlich induzierten Beendigungen gesunder Schwangerschaften (Interruptiones), die als Kontrolle dienten, zu bestimmen. Das Abort-Plazentagewebe entstammte Patientinnen, die in der 7. bis 12. SSW einen Spontanabort erlitten und daraufhin eine Abortkürretage erhalten hatten. Das Archiv der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Klinikum der Universität München – Campus Innenstadt, stellte die Paraffinschnitte der Abortplazenten zur Verfügung. Die Interruptio Plazenten stammten von Patientinnen, die einen freiwilligen Schwangerschaftsabbruch nach § 218/219 des Strafgesetzbuches zwischen der 7. und 12. SSW bei einem niedergelassenen Gynäkologen durchführen ließen. Beide Patientinnengruppen willigten zur wissenschaftlichen Verwendung ihres Plazentagewebes ein. Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München bewilligte die Studie. Die Projektnummer lautet: 337-06. Es wurde keine hormonelle Vorbehandlung der Patientinnen eingesetzt und die Interruptiones wurden durch eine komplette

Abrasio der Plazenta und des Fetus ohne Saugkürretage durchgeführt. Direkt im Anschluss an die Gewebeextraktion der Abortplazenten sowie der Interruptio Plazenten, wurden aus dem gesammelten Gewebe 5 µm dicke Gefrierschnitte mittels eines Kryostaten hergestellt, getrocknet und in Aluminiumfolie verpackt bei -20°C eingefroren.

Die Doppelimmunfluoreszenzfärbung ermöglicht die gleichzeitige Darstellung von zwei Antigenen. Das Prinzip der Färbung ist die Bindung zweier Primärantikörper unterschiedlicher Spezies an zwei spezifische Antigene. Durch speziesspezifische Fluorochrom-konjugierte Sekundärantikörper, wird diese Bindung sichtbar gemacht. Fluorochrome können Licht einer bestimmten Wellenlänge absorbieren und Photonen einer anderen Wellenlänge emittieren. Die Lichtemission durch Moleküle oder Atome, die durch Aufnahme energiereicher Strahlen ausgelöst wird, bezeichnet man als Fluoreszenz. Eine Primärfluoreszenz ist die Eigenfluoreszenz eines Stoffes und eine Sekundärfluoreszenz ist das sekundäre Aufleuchten eines Fluorochroms durch Energieanregung.

Die Inkubation von Abortplazenten aus dem 1. Trimenon mit Cytokeratin-7 (CK-7) und Prolaktin in vorherigen Doppelimmunfluoreszenz-Versuchen [174] diente zur Identifizierung bzw. zum Ausschluss von Extravillösen Trophoblasten (EVT) der fetomaternalen Interphase. Eine positive Anfärbung von Zellen mit CK-7 gilt als Marker für den Nachweis von EVT. Da Drüsen im 1. Trimenon der Schwangerschaft ebenfalls positiv auf CK-7 reagieren und EVT und Drüsen strukturell verwechselbar sind, muss ein zusätzlicher Marker für EVT herangezogen werden. Hierzu dient Prolaktin. Zellen, die zusätzlich negativ für Prolaktin sind, können als EVT identifiziert werden. RXRα- und ObR-positive-Zellen wurden als EVT identifiziert.

Vor Beginn der Versuche wurden die in Aluminiumfolie aufbewahrten Gefrierschnitte aufgetaut und anschließend für mindestens 20 min. getrocknet. Die Gefrierschnitte wurden daraufhin für 10 min. in Aceton fixiert und erneut getrocknet. Nachdem die Gefrier- und Paraffinschnitte für 3 mal 2 min. in PBS gespült wurden, folgte bei Raumtemperatur eine 15 minütige Inkubation mit Ultra V Block. Dieser blockiert die unspezifische Bindung durch elektrostatische Ladungen im Gewebe und verhindert somit unspezifische Anfärbungen. Im Anschluss wurde der Ultra V Block abgekippt. Die Primärantikörper wurden ihrem Verdünnungsverhältnis entsprechend vermischt. Zum Nachweis des Antigens RXRα wurden die Schnitte für 17h bei 4°C mit dem Anti-RXRα polyklonalen Goat IgG Antikörper (Anti-p-RXRα) (AbD Serotec, Oxford, England) (2 µg/ml) und dem M30 CytoDEATH™ monoklonalen Maus IgG2b Antikörper (Anti-M30) (Alexis, San Diego, USA) (0,125 µg/ml) inkubiert. Für die Analyse von ObR wurden der polyklonale Anti-humane Leptin Rezeptor polyklonale Ziege IgG Antikörper (Anti-p-ObR) (2 µg/ml) mit dem monoklonalen Anti-M30 (0,125 µg/ml) für 17h bei 4°C in Dako Verdünnungsmedium inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurden die

Schnitte erneut in 3 Durchgängen jeweils 2 min. in PBS gespült und daraufhin mit den Sekundärantikörpern, die mit Fluorochromen konjugiert sind, für 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Ab dem Zeitpunkt, wo Fluorochrome zum Einsatz kamen, musste der Versuch im Dunkeln stattfinden, damit die Fluorochrom-Lichtemission nicht vorzeitig durch Licht zerfällt. Die mit den verschiedenen Fluorochromen konjugierten Sekundärantikörper richten sich gegen die Tierspezies ihrer entsprechenden Primärantikörper. Somit ist eine farblich unterschiedliche Markierung der Antigene möglich. Für die Doppelimmunfluoreszenzfärbungen wurden der Cy-2 (Carbocyanin)-konjugierte Rabbit-Anti-Mouse IgG Antikörper (3,2 µg/ml) und der Cy-3 (Indocarbocyanin)-konjugierte Donkey-Anti-Goat IgG Antikörper (3,2 µg/ml), verdünnt in Dako Verdünnungsmedium, verwendet. Die Antigene RXRα und ObR werden durch eine rot leuchtende Fluoreszenz und M30 durch eine grün leuchtende Fluoreszenz sichtbar. Im Anschluss an die Applikation der Sekundärantikörper wurden die Schnitte 3 mal 2 min. in PBS gespült und daraufhin für ca. 30 min. im Dunkeln getrocknet. Eingedeckt wurde mit dem Kernfarbstoff 4'6-diamino-2-phenylindole (DAPI) Mounting Eindeckmedium, der den Kernfarbstoff enthält und selektiv an die DNA bindet. Nachdem die Schnitte mit Deckglas eingedeckt und dieses mit Nagellack fixiert wurden, folgte die Auswertung der Präparate.

Ausgewertet wurde mit dem Fluoreszenz Axioskop Fotomikroskop (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Dieses kann mit einer Quecksilberlampe ein diskontinuierliches Licht erzeugen, welches ein definiertes Lichtspektrum bzw. eine definierte Wellenlänge abgibt. Anregungsfilter im Mikroskop ermöglichen das Durchdringen von Licht einer bestimmten Wellenlänge zu den Schnitten. Diese werden dadurch mit einem Licht, das der Wellenlänge des Fluorochroms entspricht, angeregt. Zusätzlich existieren Emissionsfilter im Mikroskop, die die emittierende Wellenlänge durchlassen und das Anregungslicht zurückhalten. Die Sekundärantikörper unterscheiden sich in ihren Absorptions- und Emissionsspektren ihres Fluorochroms. Sie binden an die Epitope eines Primärantikörpers der entsprechenden Spezies, was fluoreszenzmikroskopisch sichtbar ist. Zur digitalen Bilderzeugung diente das digitale Axiocam Kamerasystem (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Insgesamt wurden in der Doppelimmunfluoreszenz 32 Plazenten pro Abort für die jeweiligen Doppelfärbungen (M30/RXRα und M30/ObR) und 32 Plazenten pro Interruptio für die Doppelfärbung (M30/RXRα und M30/ObR) analysiert.

Als Negativkontrolle wurden in der Doppelimmunfluoreszenz die Primärantikörper Anti-p-RXRα, Anti-p-ObR bzw. Anti-M30 mit PBS ersetzt, um zu überprüfen ob der Sekundärantikörper nicht durch unspezifische Bindung ein falsch positives Signal erzeugt.

### **3.5.1 Auswertung der Doppelimmunfluoreszenzfärbung**

Die Expression von RXR $\alpha$  und M30 bzw. ObR und M30 in EVT wurde mit einem Fluoreszenzmikroskop bei einer 40-fachen Vergrößerung ausgewertet. Zwei unabhängige Beobachter bewerteten die Expression der Rezeptoren.

## 4 Ergebnisse

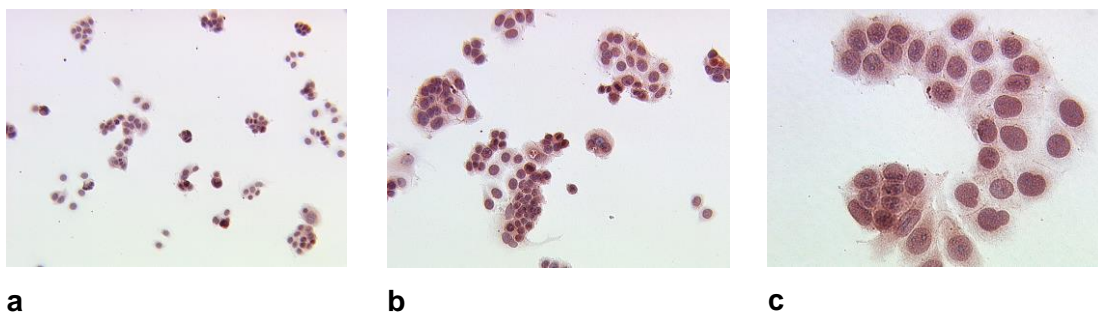
### 4.1 Regulation der RXR $\alpha$ Protein- und mRNA-Expression

#### 4.1.1 RXR $\alpha$ – Immunzytochemie

Die Immunzytochemie diente zur Detektion der RXR $\alpha$  Expression in Trophoblast- und Chorionkarzinomzellen auf Proteinebene beeinflusst durch 9-*cis*RA, ATRA und 15d-J<sub>2</sub>. Die Immunzytochemie stellt eine semi-quantitative Methode dar, da die Anfärbungsintensität der Zellen durch einen prozentualen Wert der Anfärbung ermittelt wird. Zur Sicherstellung der tatsächlichen Rezeptorenexprimierung der untersuchten Zellen wurden Positiv- sowie Negativkontrollen mitgeführt.

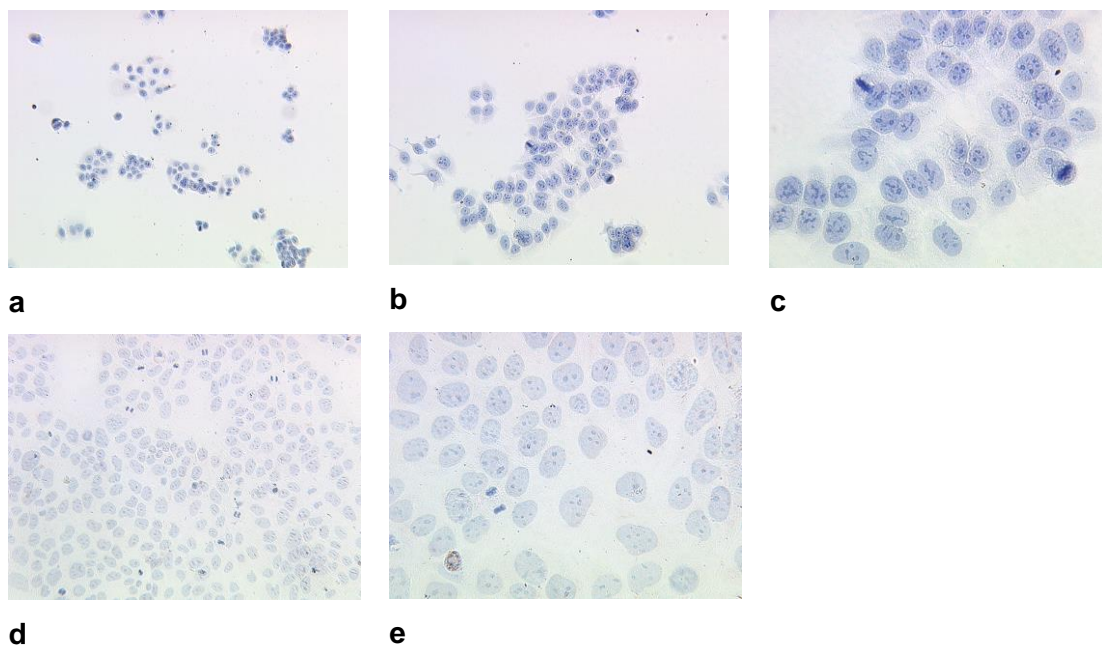
##### 4.1.1.1 RXR $\alpha$ – Positiv- und Negativkontrollen

Als Positivkontrolle für RXR $\alpha$  diente die Mammakarzinomzelllinie MCF-7, die RXR $\alpha$  exprimiert [199]. Levenson und Jordan *et al.* (1997) haben MCF-7 Zellen als erste Hormon-sensitive Mammakarzinomzelllinie etabliert, nachdem die Zellen 1970 einer Patientin mit metastasiertem Mammakarzinom entnommen wurden [200]. Die MCF-7 Zellen wurden wie die Chorionkarzinom- und HVT-Zellen nach dem Färbeprotokoll von RXR $\alpha$  aus 3.2.1.2 immunzytochemisch untersucht. Die Positivkontrollen sind in Abbildung 7 dargestellt.



**Abbildung 7: Positivkontrollen von RXR $\alpha$  an MCF-7 Zellen** a) RXR $\alpha$  Positivkontrolle an MCF-7 Zellen, Vergrößerung: x6.8 b) RXR $\alpha$  Positivkontrolle an MCF-7 Zellen, x10 c) RXR $\alpha$  Positivkontrolle an MCF-7 Zellen, x25. Endkonzentration von Anti-RXR $\alpha$ : 5  $\mu$ g/ml

Als Primärantikörper für die Negativkontrolle wurde die Maus IgG Isotypen Kontrolle verwendet. Die Negativkontrolle ist in Abbildung 8 dargestellt.

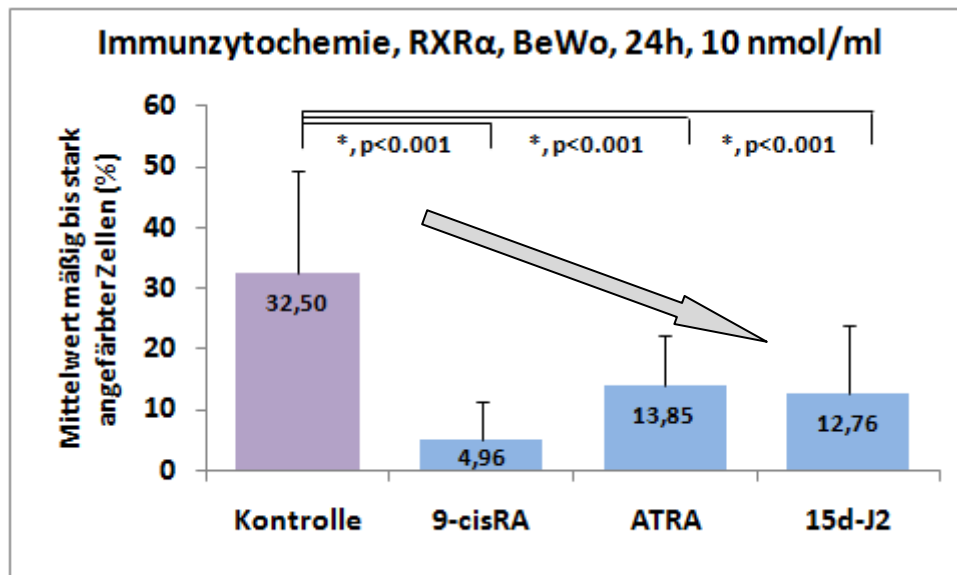


**Abbildung 8: Negativkontrollen von RXR $\alpha$  an MCF-7 und JEG-3-Zellen** a) RXR $\alpha$  Negativkontrolle, MCF-7 Zellen, Maus IgG Isotypen Kontrolle, Vergrößerung x6.8 b) RXR $\alpha$  Negativkontrolle, MCF-7 Zellen, Maus IgG Isotypen Kontrolle, x10 c) RXR $\alpha$  Negativkontrolle, MCF-7 Zellen, Maus IgG Isotypen Kontrolle, x25 d) RXR $\alpha$  Negativkontrolle, JEG-3, Maus IgG Isotypen Kontrolle, x10 e) RXR $\alpha$  Negativkontrolle, JEG-3 Zellen, Maus IgG Isotypen Kontrolle, x25. Endkonzentration von Maus IgG Isotypen Kontrolle: 5  $\mu$ g/ml

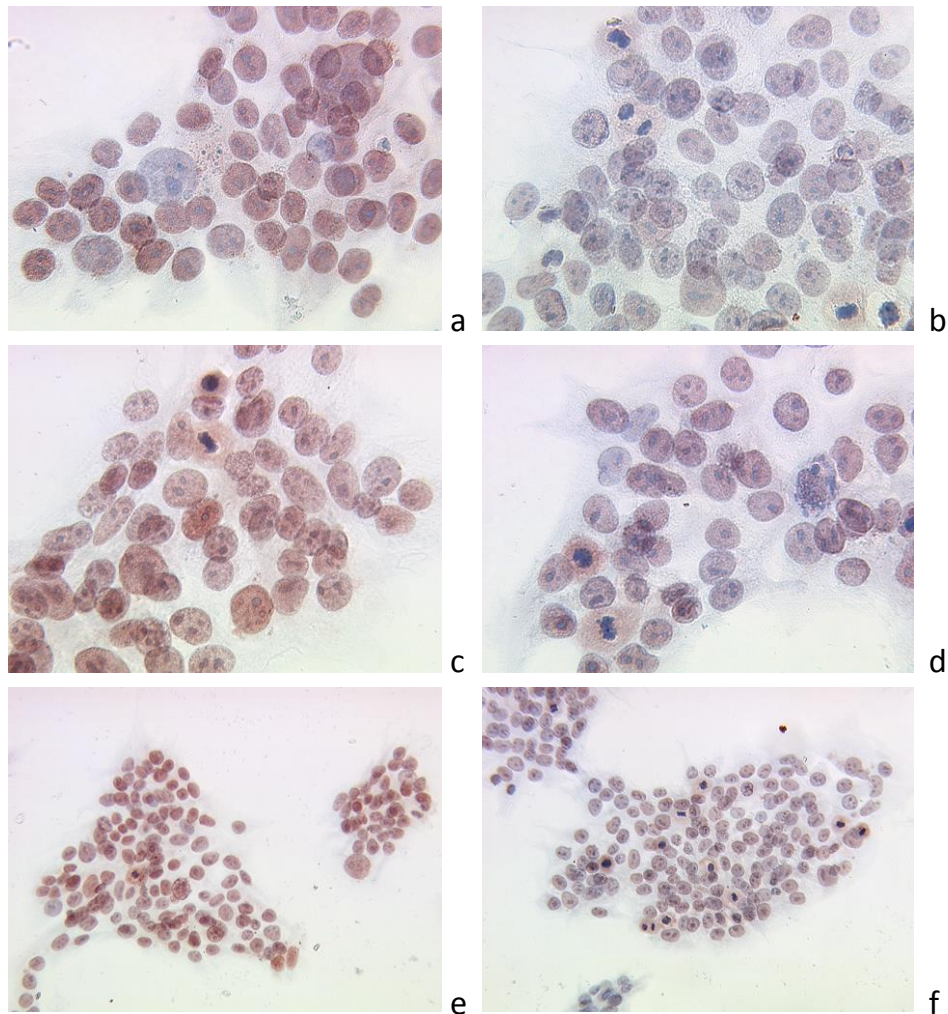
#### 4.1.1.2 RXR $\alpha$ Proteinexpression in BeWo Zellen

Die Menge der unterschiedlichen Kernanfärbungsintensitäten der Zellen (negativ, schwach, mäßig, stark) wurde in Prozent (%) angegeben. Der Mittelwert aus mäßig bis stark angefärbten BeWo Zellen (bzw. JEG-3 Zellen) (in %) wurde ermittelt und diente als Referenzwert. Die Kernanfärbung reflektiert die Expression des Antigens RXR $\alpha$ . Je intensiver die Intensität der Kernanfärbung, desto stärker die RXR $\alpha$  Proteinexpression. Bei einer Konzentration von 10 nmol/ml induzierten 9-*cis*RA, ATRA und 15d-J<sub>2</sub> nach Stimulation der BeWo Zellen für 24h eine signifikante ( $p < 0.001$ ) Abnahme der RXR $\alpha$  Proteinexpression im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 9). Die abgeschwächte Anfärbung der für 24h mit 9-*cis*RA, ATRA und 15d-J<sub>2</sub> stimulierten BeWo Zellen, im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen, ist in Abbildung 10 zu erkennen. Auffallend ist das Fusionsverhalten der BeWo Zellen. Nach einer Inkubationszeit von 48h führten 10 nmol/ml der jeweiligen Substanzen ebenfalls zu einer signifikanten Inhibierung der RXR $\alpha$  Proteinexpression (Abbildung 11 und Abbildung 12). Von den drei verwendeten Substanzen besaß 10 nmol/ml 9-*cis*RA nach 24h (Abbildung 9) und insbesondere nach 48h (Abbildung 11) den stärksten Einfluss auf die Inhibierung der RXR $\alpha$  Expression. Nach 48h führten 10 nmol/ml 9-*cis*RA zu einer Abnahme des Mittelwertes der mäßig- bis stark angefärbten BeWo Zellen von 34,4% auf 2,3%. Eine 24-stündige Inkubation der BeWo Zellen mit 10 nmol/ml des Prostaglandins (Abbildung 9) und der Retinoide (Abbildung 9) hatte einen geringeren Effekt auf die Reduktion der RXR $\alpha$  Expression als eine Inkubation mit diesen für 48h (Abbildung 11).

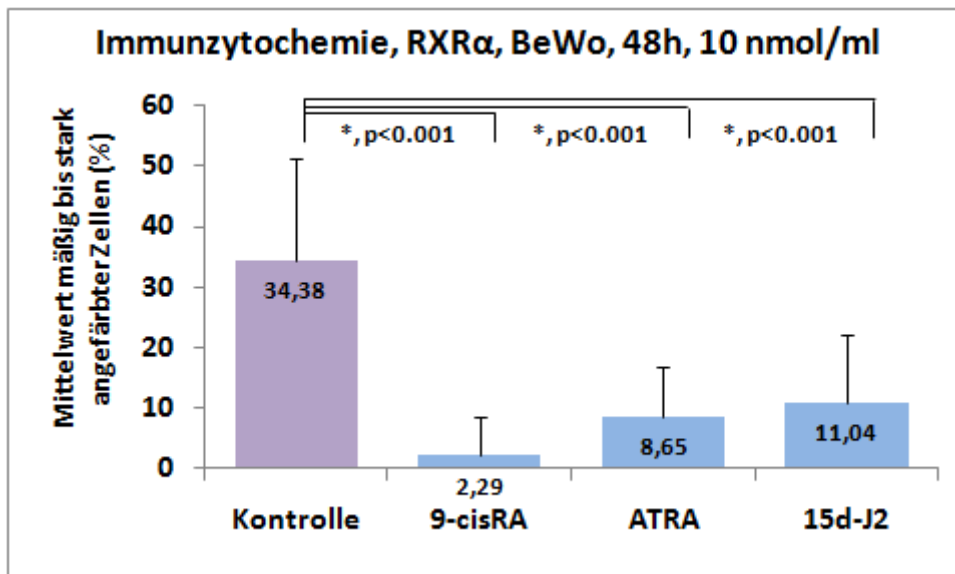




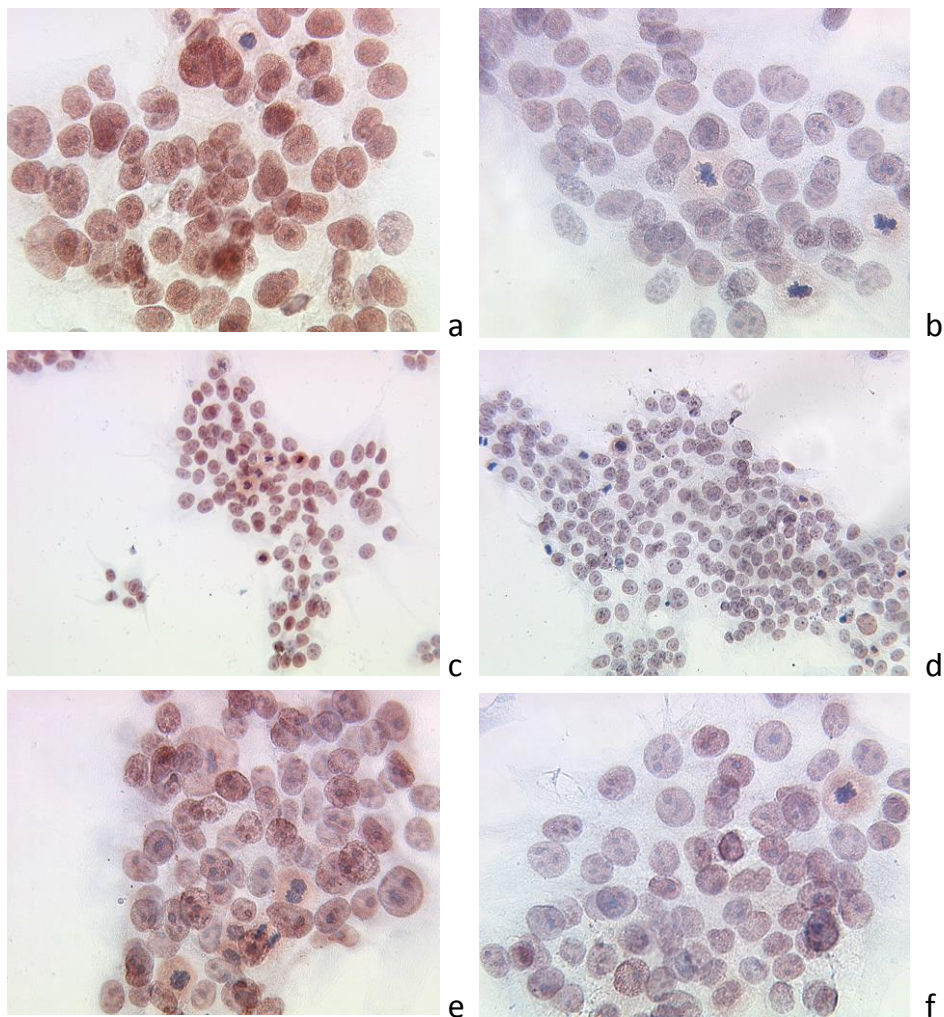
**Abbildung 9: Immunzytochemische Analyse der RXR $\alpha$  Expression nach Inkubation von BeWo Zellen mit 10 nmol/ml 9-cisRA, ATRA und 15d-J<sub>2</sub> für 24h.** Die Ergebnisse sind als Mittelwert mäßig bis stark angefarbter Zellen in Prozent dargestellt. Die drei Substanzen induzierten eine signifikante (\*,  $p < 0.001$ ) Reduktion der RXR $\alpha$  Proteinexpression.  $\Rightarrow$  = Abnahme der Expression



**Abbildung 10: Digitale Aufnahmen der RXR $\alpha$  Expression in BeWo Zellen nach Inkubation mit 10 nmol/ml 9-cisRA, ATRA und 15d-J<sub>2</sub> für 24h** a, c, e) BeWo Kontrolle, unstimuliert, 24h, b) Inkubation von BeWo Zellen mit 10 nmol/ml 9-cisRA für 24h, Vergrößerung: x25 d) Inkubation von BeWo mit 10 nmol/ml ATRA für 24h, x25 f) Inkubation von BeWo mit 10 nmol/ml 15d-J<sub>2</sub> für 24h, x10.



**Abbildung 11:** Immunzytochemische Analyse der RXR $\alpha$  Expression nach Inkubation von BeWo Zellen mit 10 nmol/ml 9-cisRA, ATRA und 15d-J<sub>2</sub> für 48h. Eine 48 stündige Inkubation von BeWo mit 10 nmol/ml 9-cisRA, ATRA und 15d-J<sub>2</sub> induzierte eine signifikante (\*,  $p < 0.001$ ) Abnahme der RXR $\alpha$  Expression.

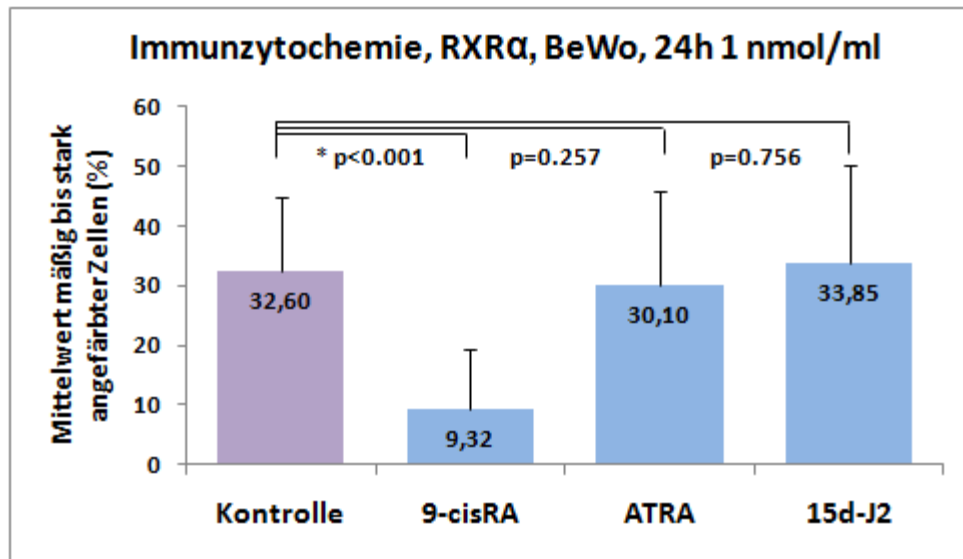


**Abbildung 12:** Digitale Aufnahmen der RXR $\alpha$  Expression in BeWo Zellen nach Inkubation mit 10 nmol/ml 9-cisRA, ATRA und 15d-J<sub>2</sub> für 48h. a, c, e) BeWo Kontrolle, unstimuliert, 48h b) Inkubation von BeWo mit 10 nmol/ml 9-cisRA für 48h, Vergrößerung: x25 d) Inkubation von BeWo mit 10 nmol/ml ATRA für 48h, x10 f) Inkubation von BeWo mit 10 nmol/ml 15d-J<sub>2</sub> für 48h, x25.

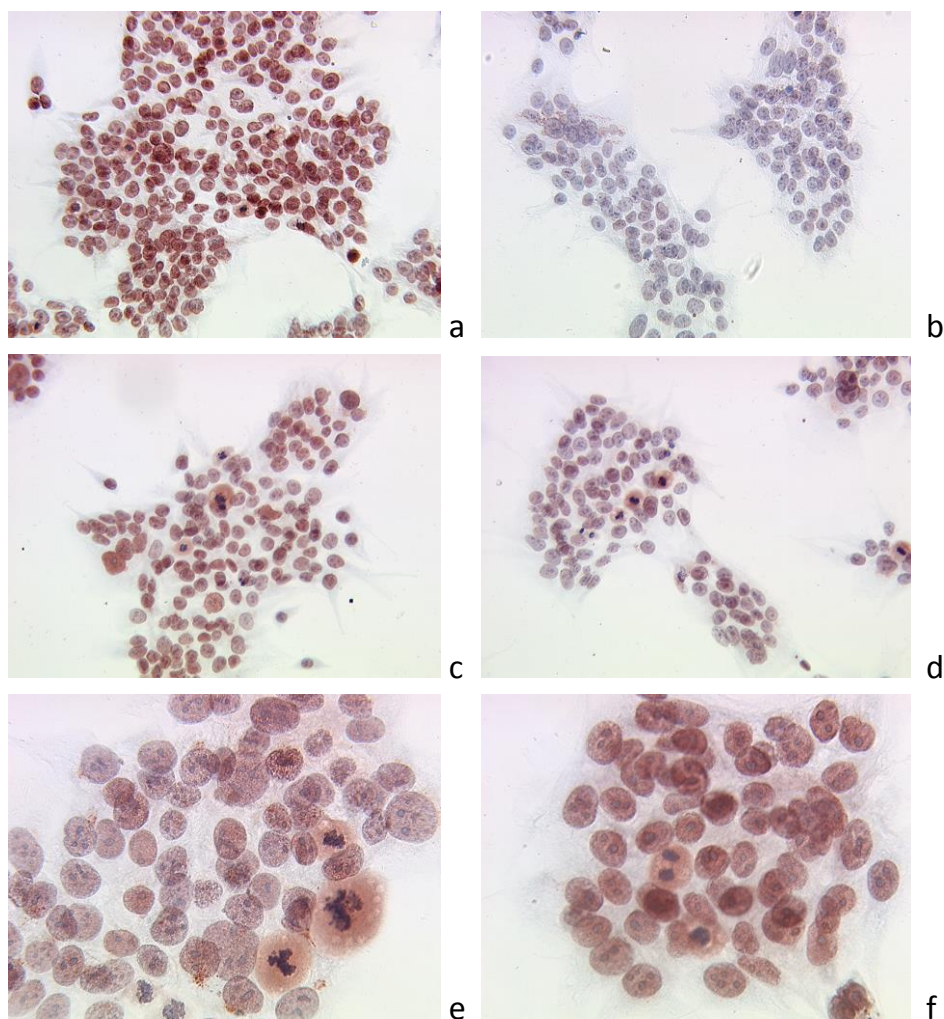
Im Anschluss an die Untersuchung des Einflusses von 10 nmol/ml 9-*cis*RA, ATRA und 15d-J<sub>2</sub> auf die RXRα Expression in BeWo Zellen wurde zusätzlich die Wirkung der Substanzen bei einer Konzentration von 1 nmol/ml auf die RXRα Expression in BeWo Zellen untersucht. 9-*cis*RA führte bei einer Konzentration von 1 nmol/ml zu einer signifikanten ( $p < 0.001$ ) Abnahme der RXRα Proteinexpression in BeWo Zellen nach 24h sowie nach 48h. Dies ist aus Abbildung 13 und Abbildung 15 ersichtlich. Eine Inkubation der BeWo Zellen mit 1 nmol/ml 15d-J<sub>2</sub> erbrachte weder nach 24h noch nach 48h einen Unterschied in der Intensitätsanfärbung der Zellen (Abbildung 14 e, f und Abbildung 16 e, f). Somit war keine Veränderung in der RXRα Proteinexpression für 15d-J<sub>2</sub> erkennbar (Abbildung 13 und Abbildung 15). Nach 24h führte 1 nmol/ml ATRA in BeWo Zellen zu einer Reduktion der RXRα Expression, die sich jedoch als nicht signifikant erwies (Abbildung 13, Abbildung 14 c, d). ATRA erreichte bei einer Konzentration von 1 nmol/ml in BeWo Zellen erst nach 48h eine signifikante ( $p = 0.042$ ) Inhibierung der RXRα Expression (Abbildung 16 c, d). Dabei induzierte ATRA eine Abnahme der durchschnittlichen mäßig bis stark angefärbten Zellen von 30,4% auf 26% (Abbildung 15).

Insgesamt hatten die Substanzen 9-*cis*RA, ATRA und 15d-J<sub>2</sub> bei einer Konzentration von 10 nmol/ml einen stärkeren Effekt auf die RXRα Proteinexpression in BeWo Zellen als bei einer Konzentration von 1 nmol/ml. Somit konnte ein dosisabhängiger Effekt der Retinoide und des Prostaglandins auf die RXRα Inhibierung festgestellt werden.

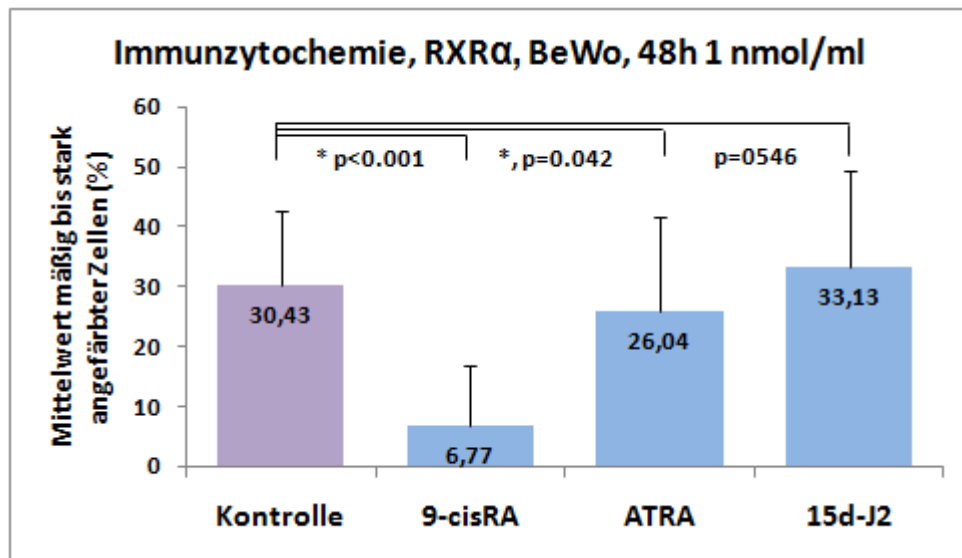




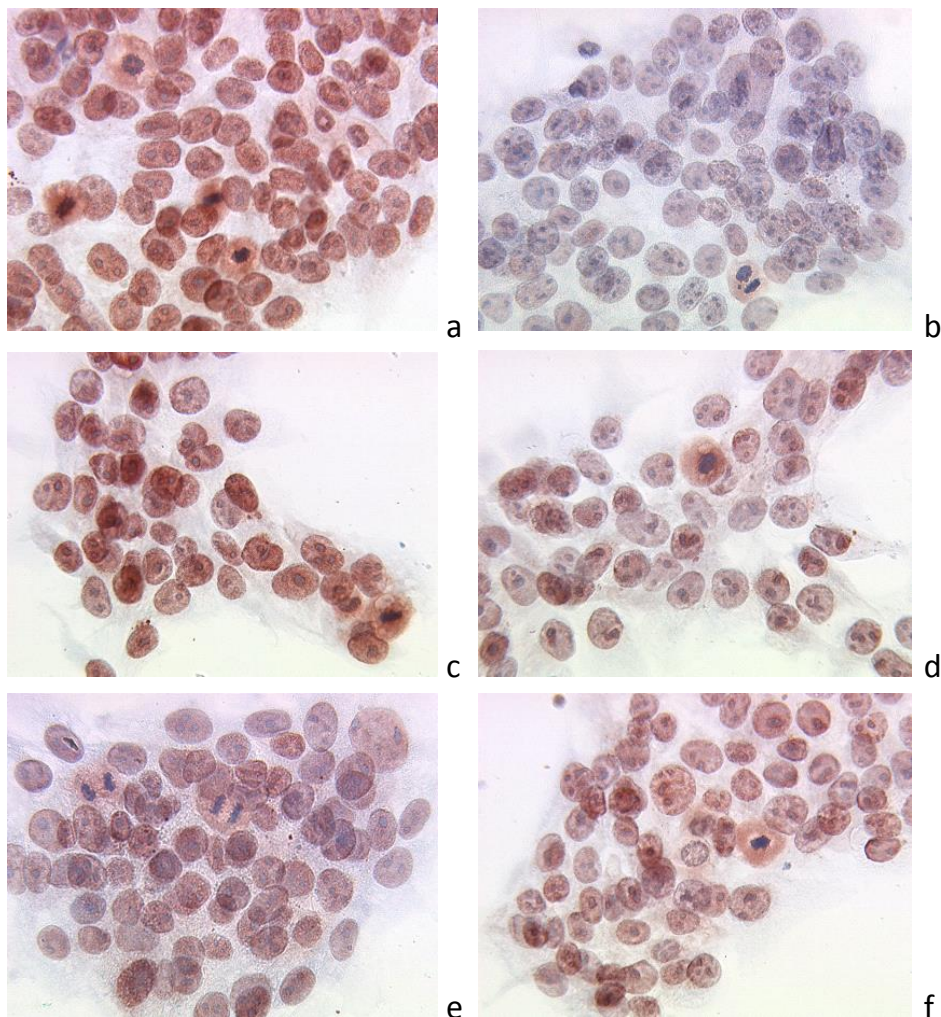
**Abbildung 13: Immunzytochemische Analyse der RXR $\alpha$  Expression nach Inkubation von BeWo Zellen mit 1 nmol/ml 9-cisRA, ATRA und 15d-J<sub>2</sub> für 24h.** 1 nmol/ml 9-cisRA führte nach 24h zu einer signifikanten Reduktion von RXR $\alpha$ . ATRA und 15d-J<sub>2</sub> induzierten keine signifikanten Unterschiede.



**Abbildung 14: Digitale Aufnahmen der RXR $\alpha$  Expression in BeWo Zellen nach Inkubation mit 1 nmol/ml 9-cisRA, ATRA und 15d-J<sub>2</sub> für 24h** a, c, e) BeWo Kontrolle, unstimuliert, 24h b) Inkubation von BeWo mit 1 nmol/ml 9-cisRA für 24h, Vergrößerung: x10 d) Inkubation von BeWo mit 1 nmol/ml ATRA für 24h, x10 f) Inkubation von BeWo mit 1 nmol/ml 15d-J<sub>2</sub> für 24h, x25.



**Abbildung 15:** Immunzytochemische Analyse der RXR $\alpha$  Expression nach Inkubation von BeWo Zellen mit 1 nmol/ml 9-cisRA, ATRA und 15d-J<sub>2</sub> für 48h. 1 nmol/ml 9-cisRA und 1 nmol/ml ATRA induzierten eine signifikante Reduktion der RXR $\alpha$  Expression.



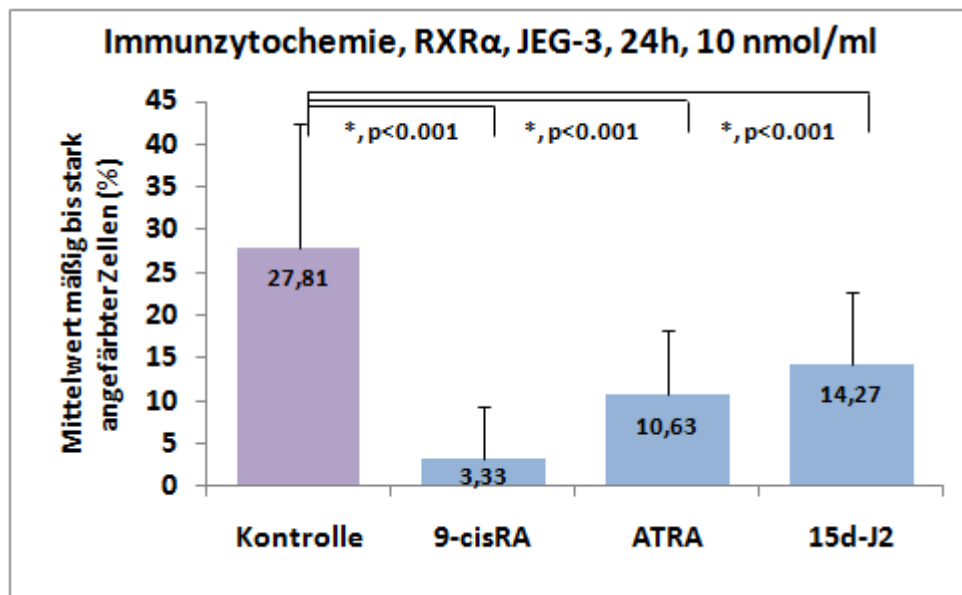
**Abbildung 16:** Digitale Aufnahmen der RXR $\alpha$  Expression in BeWo Zellen nach Inkubation mit 1 nmol/ml 9-cisRA, ATRA und 15d-J<sub>2</sub> für 48h. a, c, e) BeWo Kontrolle, unstimuliert, 48h b) Inkubation von BeWo mit 1 nmol/ml 9-cisRA für 48h, Vergrößerung: x25 d) Inkubation von BeWo mit 1 nmol/ml ATRA für 48h, x25 f) Inkubation von BeWo mit 1 nmol/ml 15d-J<sub>2</sub> für 48h, x25.

#### 4.1.1.3 RXR $\alpha$ Proteinexpression in JEG-3 Zellen

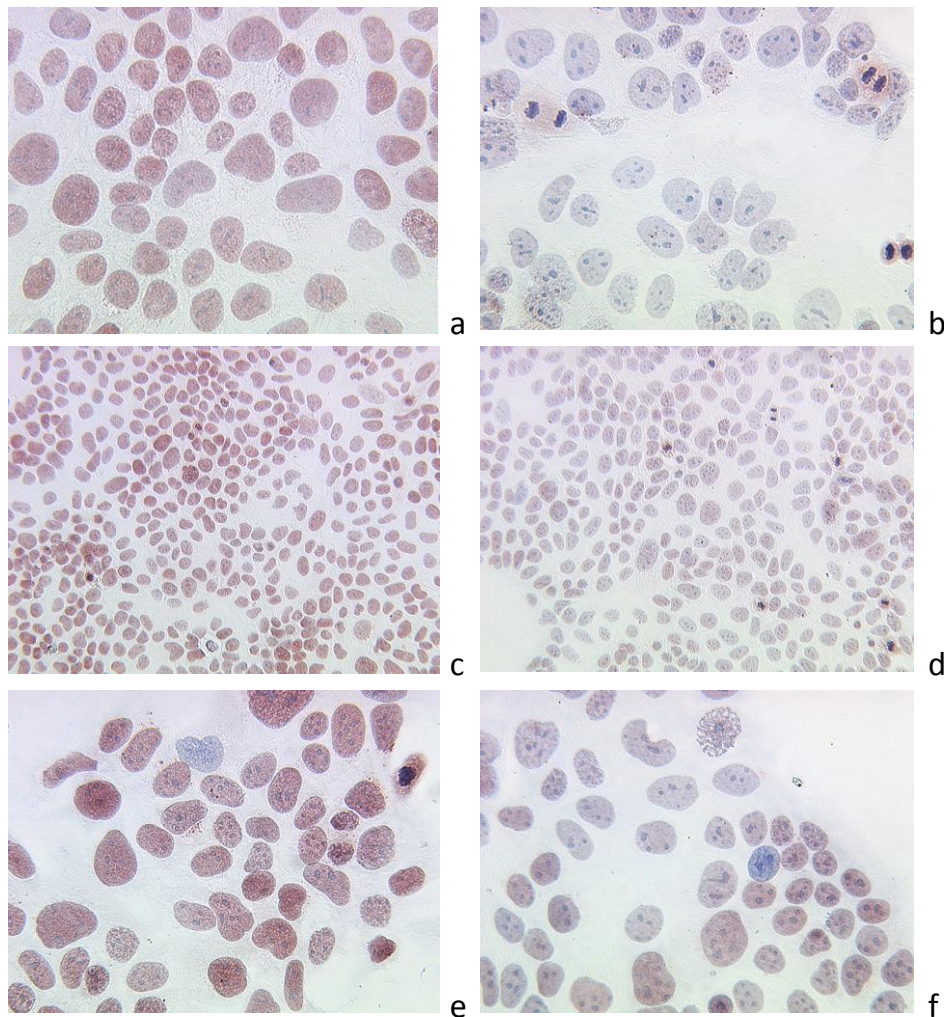
Wie bereits in der Chorionkarzinomzelllinie BeWo beobachtet werden konnte, führten 10 nmol/ml 9-*cis*RA, ATRA und 15d-J<sub>2</sub> sowohl nach 24h (Abbildung 17) wie nach 48h (Abbildung 19) in JEG-3 Zellen ebenfalls zu einer signifikanten ( $p < 0.001$ ) Reduktion der RXR $\alpha$  Proteinexpression. Der Gesamteffekt der drei verwendeten Substanzen auf die Abnahme der RXR $\alpha$  Proteinexpression in JEG-3 Trophoblasttumorzellen kann in folgender Reihenfolge mit absteigender Wirkung sortiert werden: 9-*cis*RA > ATRA > 15d-J<sub>2</sub>. Die signifikant verminderte Expression von RXR $\alpha$  in JEG-3 Zellen nach einer Stimulationszeit von 24h bzw. 48h ist an der schwächeren Anfärbung der stimulierten Zellen im Vergleich zur stärker angefärbten Kontrolle in Abbildung 18 und Abbildung 20 erkennbar. 10 nmol/ml der Retinoide führten bei einer Inkubationszeit von 48h (Abbildung 19) zu einer stärkeren Inhibierung der RXR $\alpha$  Expression als nach einer 24-stündigen Inkubation (Abbildung 17).

Nach 24h induzierte die Retinsäure 9-*cis*RA bei einer Konzentration von 1 nmol/ml eine signifikante ( $p < 0.001$ ) Reduktion der RXR $\alpha$  Proteinexpression (Abbildung 21). Der Durchschnitt der mäßig bis stark angefärbten JEG-3 Zellen wurde durch 9-*cis*RA bei einer Konzentration von 1 nmol/ml nach 24h von 28,5% auf 7,7% reduziert (Abbildung 21). Nach 48h führte 1 nmol/ml 9-*cis*RA ebenfalls zu einer signifikanten Abnahme der RXR $\alpha$  Proteinexpression (Abbildung 23). Dies ist in Abbildung 24 a und b durch die schwächere Anfärbung der stimulierten JEG-3 Zellen im Vergleich zu den Kontrollen verdeutlicht. 1 nmol/ml ATRA führte in JEG-3 Zellen nach 24h sowie nach 48h zu einer signifikanten ( $p < 0.001$ ) Inhibierung der RXR $\alpha$  Expression. Der Unterschied der RXR $\alpha$  Expression der BeWo Zellen, die mit 1 nmol/ml ATRA stimuliert wurden, im Vergleich zu der RXR $\alpha$  Expression in den unbehandelten JEG-3 Zellen, ist für eine Inkubationszeit von 24h in Abbildung 22 (c und d) und für eine Inkubationszeit von 48h in Abbildung 24 (c und d) erkennbar. Das Prostaglandin 15d-J<sub>2</sub> beeinflusste die RXR $\alpha$  Expression in BeWo Zellen bei einer Konzentration von 1 nmol/ml weder nach 24h noch nach 48h. In Abbildung 22 und Abbildung 24, jeweils e und f, ist keine Veränderung der Anfärbungsintensität der JEG-3 Zellen bedingt durch 1 nmol/ml 15d-J<sub>2</sub> zu erkennen.





**Abbildung 17:** Immunzytochemische Analyse der RXR $\alpha$  Expression nach Inkubation von JEG-3 Zellen mit 10 nmol/ml 9-*cis*RA, ATRA und 15d-J<sub>2</sub> für 24h. Die RXR $\alpha$  Proteinexpression in JEG-3 Zellen wurde durch die Inkubation mit 10 nmol/ml 9-*cis*RA, ATRA und 15d-J<sub>2</sub> signifikant reduziert.



**Abbildung 18:** Digitale Aufnahmen der RXR $\alpha$  Expression in JEG-3 Zellen nach Inkubation mit 10 nmol/ml 9-*cis*RA, ATRA und 15d-J<sub>2</sub> für 24h a, c, e) JEG-3 Kontrolle, unstimuliert, 24h b) Inkubation von JEG-3 mit 10 nmol/ml 9-*cis*RA für 24h, Vergrößerung: x25 d) Inkubation von JEG-3 mit 10 nmol/ml ATRA für 24h, x10 f) Inkubation von JEG-3 mit 10 nmol/ml 15d-J<sub>2</sub> für 24h, x25.

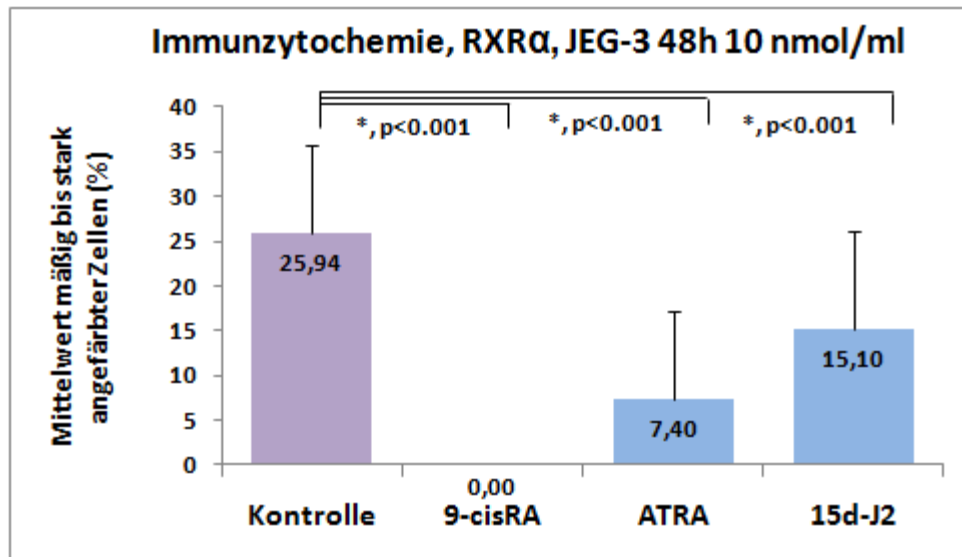


Abbildung 19: Immunzytochemische Analyse der RXR $\alpha$  Expression nach Inkubation von JEG-3 Zellen mit 10 nmol/ml 9-cisRA, ATRA und 15d-J<sub>2</sub> für 48h.

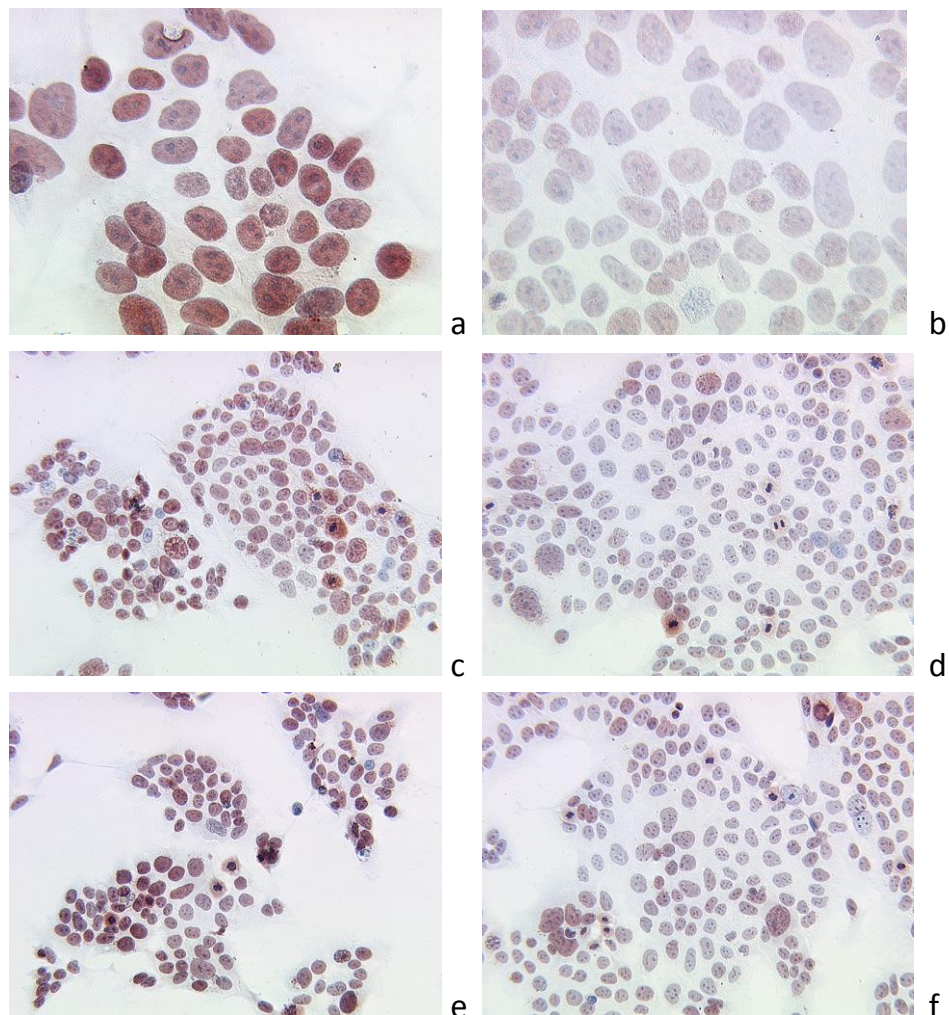
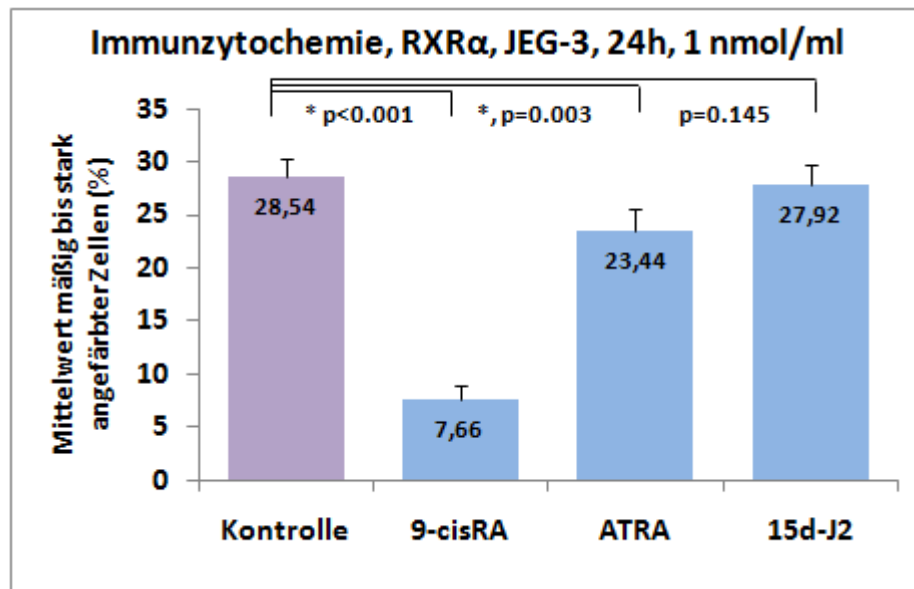
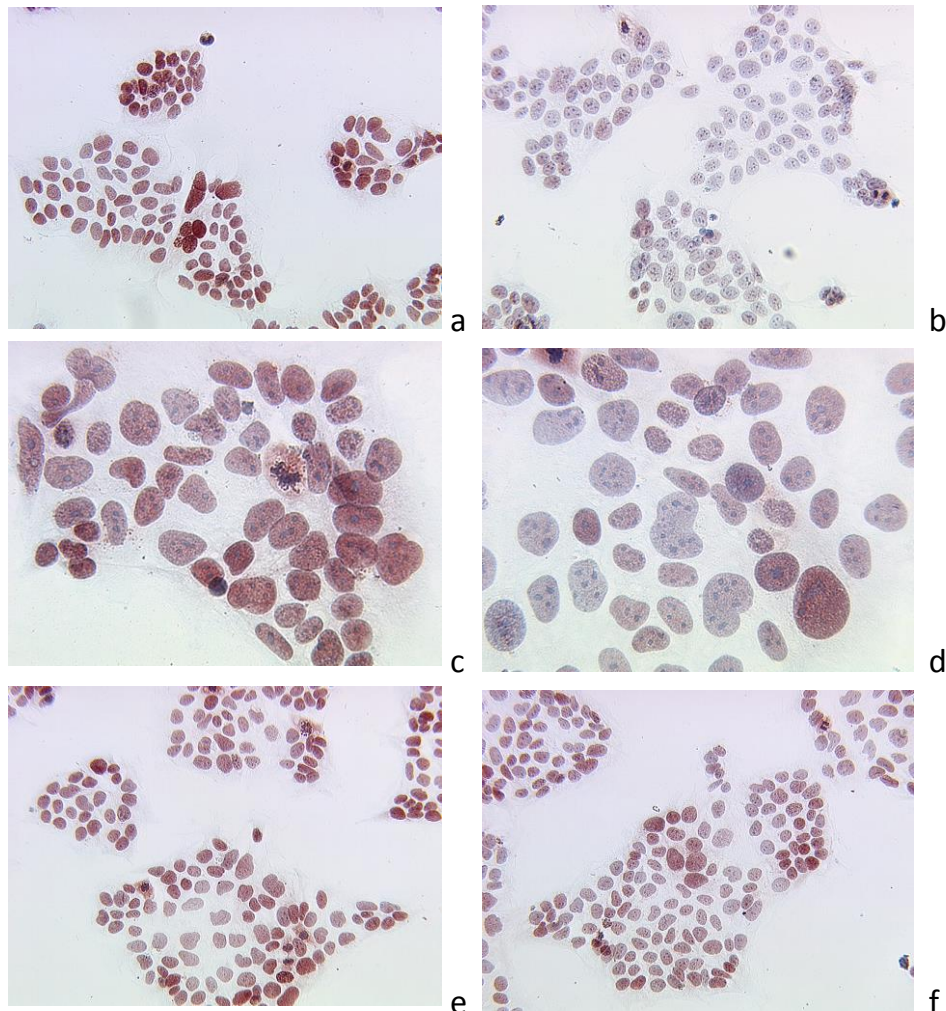


Abbildung 20: Digitale Aufnahmen der RXR $\alpha$  Expression in JEG-3 Zellen nach Inkubation mit 10 nmol/ml 9-cisRA, ATRA und 15d-J<sub>2</sub> für 48h a, c, e) JEG-3 Kontrollen, unstimuliert, 48h b) Inkubation von JEG-3 mit 10 nmol/ml 9-cisRA für 48h, Vergrößerung: x25 d) Inkubation von JEG-3 mit 10 nmol/ml ATRA für 48h, x10 f) Inkubation von JEG-3 mit 10 nmol/ml 15d-J<sub>2</sub> für 48h, x10.





**Abbildung 21:** Immunzytochemische Analyse der RXR $\alpha$  Expression nach Inkubation von JEG-3 Zellen mit 1 nmol/ml 9-cisRA, ATRA und 15d-J<sub>2</sub> für 24h. 9-cisRA und ATRA induzierten eine signifikante Reduktion der RXR $\alpha$  Expression.



**Abbildung 22:** Digitale Aufnahmen der RXR $\alpha$  Expression in JEG-3 Zellen nach Inkubation mit 1 nmol/ml 9-cisRA, ATRA und 15d-J<sub>2</sub> für 24h a, c, e) JEG-3 Kontrolle, unstimuliert, 24h b) Inkubation von JEG-3 mit 1 nmol/ml 9-cisRA für 24h, Vergrößerung: x10 d) Inkubation von BeWo mit 1 nmol/ml ATRA für 24h, x25 f) Inkubation von JEG-3 mit 1 nmol/ml 15d-J<sub>2</sub> für 24h, x10.

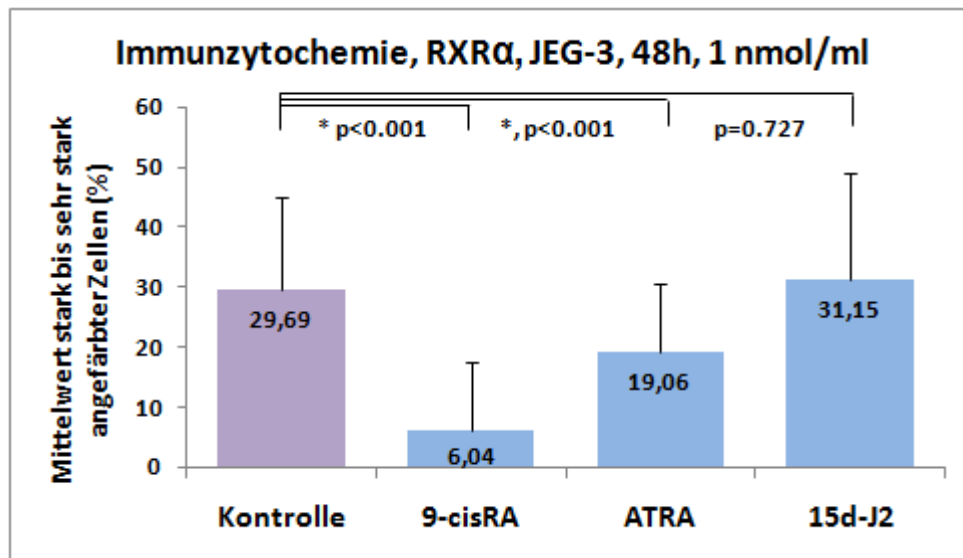


Abbildung 23: Immunzytochemische Auswertung der RXR $\alpha$  Expression nach Inkubation von JEG-3 Zellen mit 1 nmol/ml 9-cisRA, ATRA und 15d-J<sub>2</sub> für 48h.

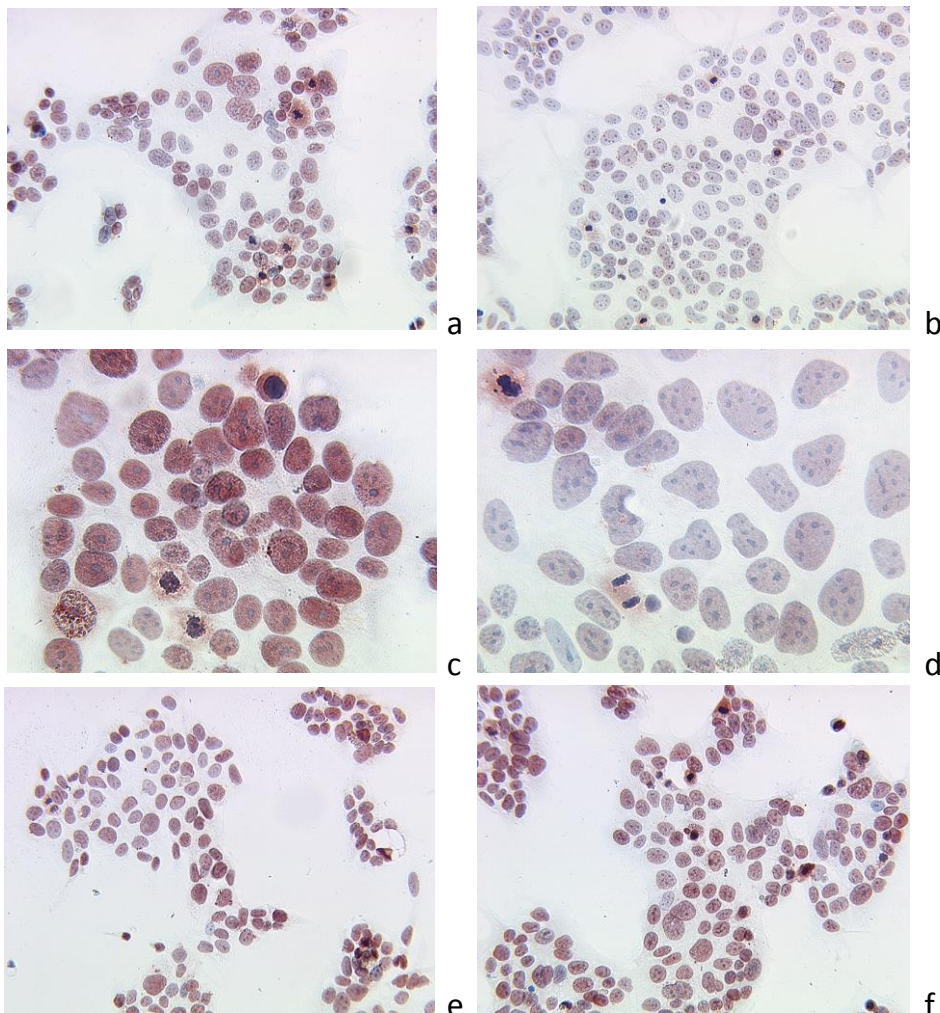
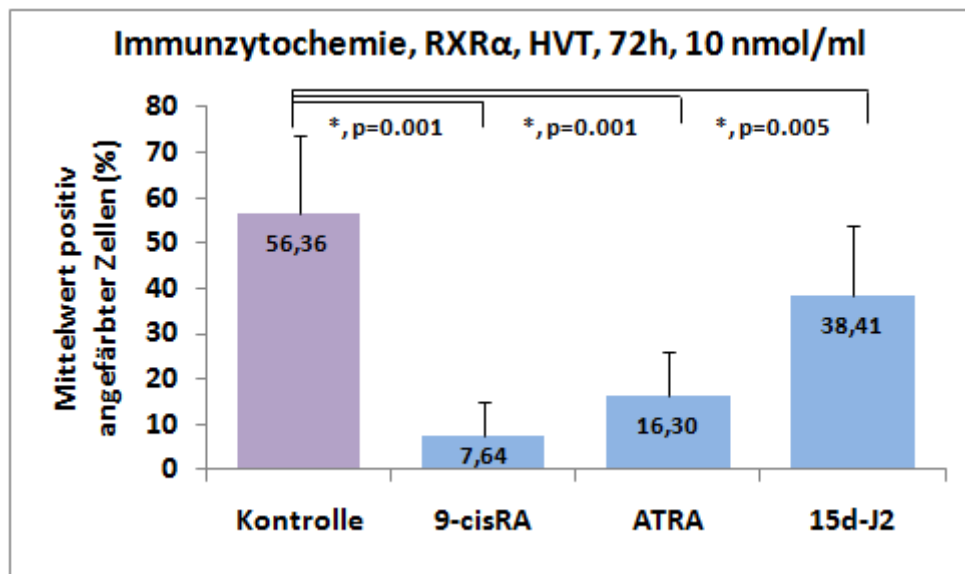


Abbildung 24: Digitale Aufnahmen der RXR $\alpha$  Expression in JEG-3 Zellen nach Inkubation mit 1 nmol/ml 9-cisRA, ATRA und 15d-J<sub>2</sub> für 48h a, c, e) JEG-3 Kontrolle, unstimuliert, 48h b) Inkubation von JEG-3 mit 1 nmol/ml 9-cisRA für 48h, Vergrößerung: x10 d) Inkubation von JEG-3 mit 1 nmol/ml ATRA für 48h, x25 f) Inkubation von JEG-3 mit 1 nmol/ml 15d-J<sub>2</sub> für 48h, x10.

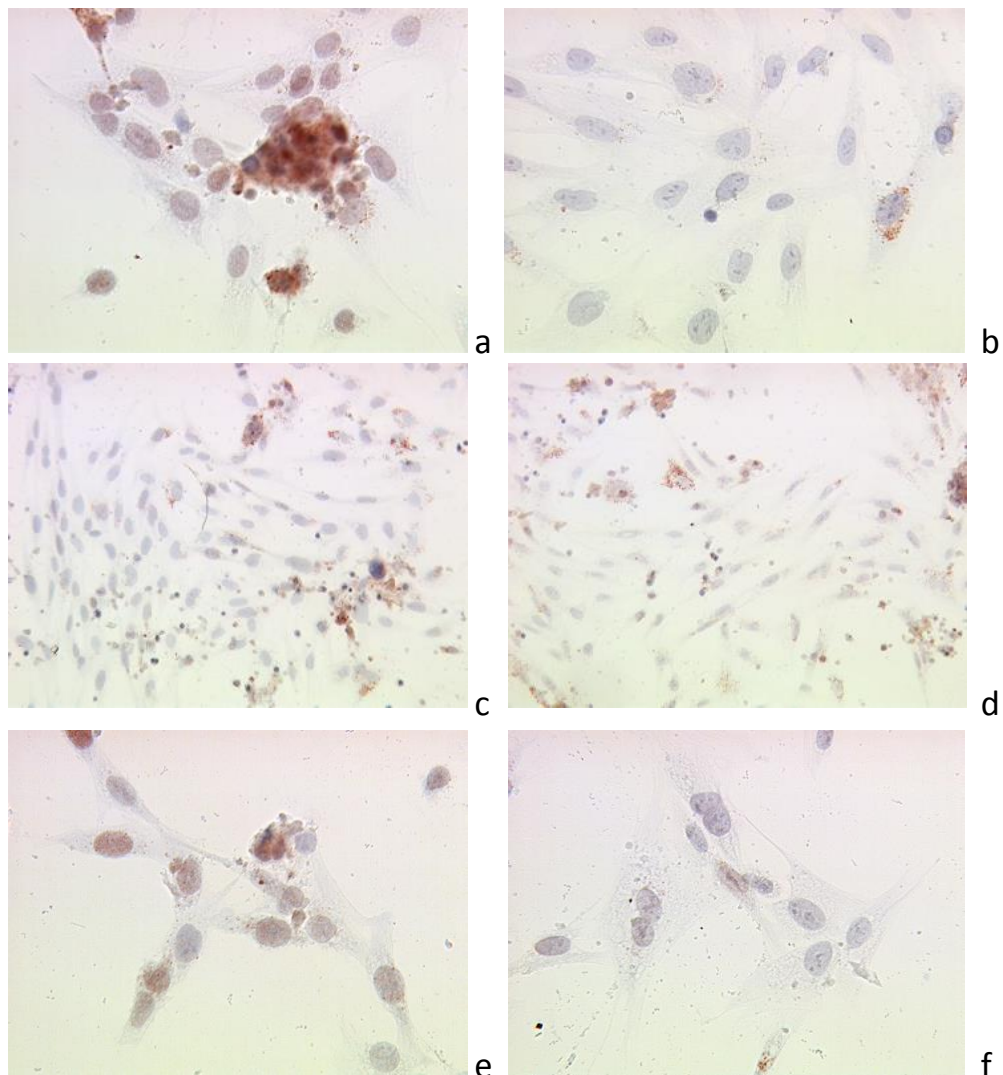
#### 4.1.1.4 RXR $\alpha$ Expression in HVT

In humanen villösen Trophoblasten (HVT) induzierten die Retinoide 9-*cis*RA und ATRA und der PPAR $\gamma$  Ligand 15d-J<sub>2</sub> bei einer Konzentration von 10 nmol/ml und nach einer Inkubationszeit von 72h eine signifikante ( $p < 0.05$ ) Reduktion der RXR $\alpha$  Proteinexpression (Abbildung 25). Somit konnte eine Liganden-abhängige Inhibierung der RXR $\alpha$  Expression in primären Trophoblastkulturen sowie in Chorionkarzinomzelllinien beobachtet werden. Für die immunzytochemische Analyse wurde der prozentuale Anteil der 1-fach positiv angefärbten HVT der stimulierten und der unbehandelten HVT verglichen. Die Kontrolle weist im Vergleich zu den stimulierten HVT einen höheren Anteil positiv angefärbter Zellen auf (

Abbildung 26). Retinoide hatten einen stärkeren Einfluss auf die Reduktion der RXR $\alpha$  Expression in HVT als der PPAR $\gamma$ -Agonist 15d-J<sub>2</sub>.



**Abbildung 25:** Immunzytochemische Analyse der RXR $\alpha$  Expression nach Inkubation von HVT-Zellen mit 10 nmol/ml 9-cisRA, ATRA und 15d-J<sub>2</sub> für 72h. Die drei Substanzen induzierten eine signifikante Abnahme der RXR $\alpha$  Expression



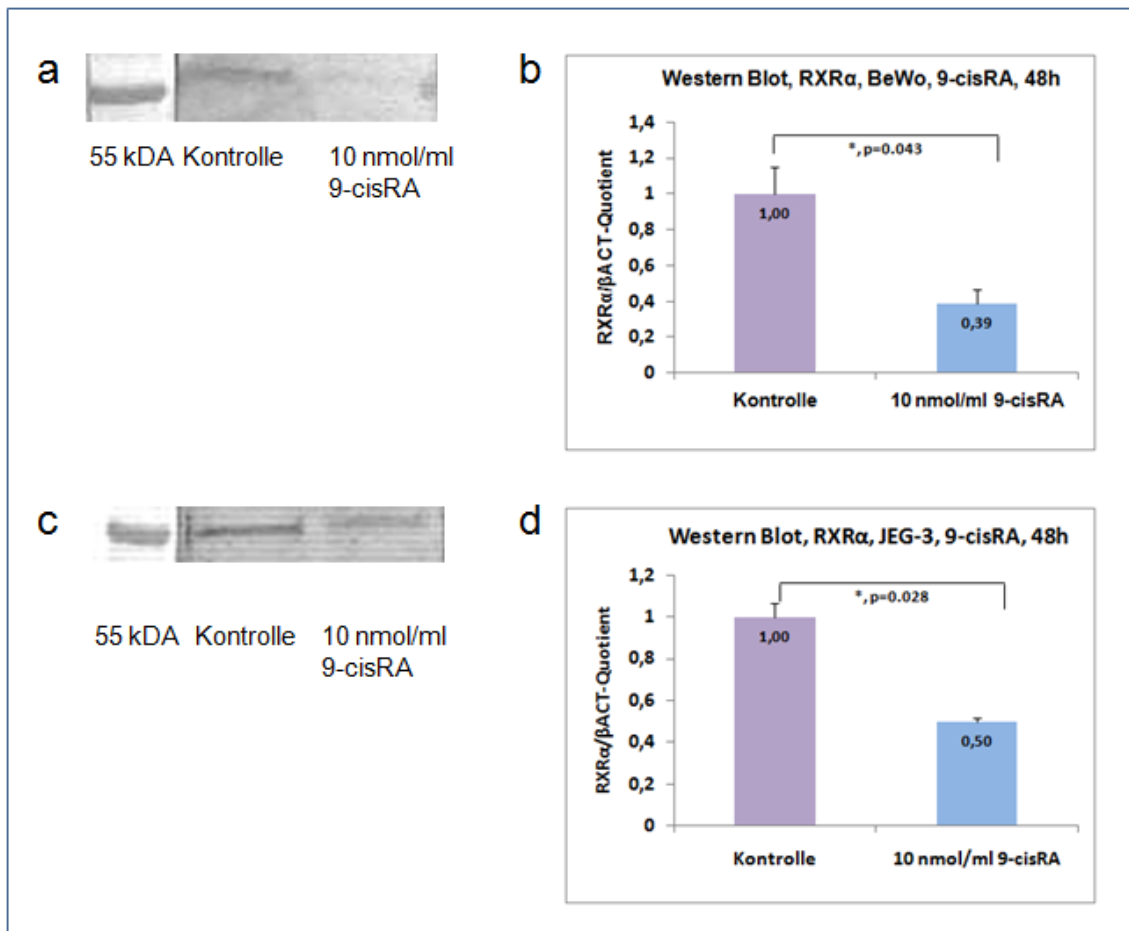
**Abbildung 26:** Digitale Aufnahmen der RXR $\alpha$  Expression in HVT nach Inkubation mit 10 nmol/ml 9-cisRA, ATRA und 15d-J<sub>2</sub> für 72h. **a, c, e)** HVT Kontrolle, unstimuliert, 72h **b)** Inkubation von HVT mit 10 nmol/ml 9-cisRA für 72h, Vergrößerung: x25 **d)** Inkubation von HVT mit 10 nmol/ml ATRA für 72h, x10 **f)** Inkubation von HVT mit 10 nmol/ml 15d-J<sub>2</sub> für 72h, x25.



#### 4.1.2 RXR $\alpha$ – Western Blot von BeWo und JEG-3 Zellen

Der Western Blot stellt zusätzlich zu der Immunzytochemie eine Nachweismethode der RXR $\alpha$  Expression auf Proteinebene dar. Die Ergebnisse des Western Blots sind in Abbildung 27 dargestellt. In BeWo Zellen generierte RXR $\alpha$  eine Proteinbande bei einer molekularen Masse von 60 kDa, der sich über dem Richtwert 55 kDa befindet (Abbildung 27 a). Die linke Bande des Western Blots repräsentiert die unstimulierten BeWo Zellen und die rechte Bande repräsentiert die BeWo Zellen, die für 48h mit 10 nmol/ml 9-*cis*RA behandelt wurden (Abbildung 27 a). Es kann eine stärkere Anfärbung der Kontrolle im Vergleich zu den stimulierten BeWo Zellen detektiert werden (Abbildung 27 a). Diese Beobachtung wurde mittels der Bio-Rad Quantity One® Software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) quantifiziert. Als Standardprobe diente  $\beta$ -Actin ( $\beta$ ACT). Die Anfärbungsintensität der RXR $\alpha$  Proteinbanden von stimulierten und unstimulierten BeWo Zellen wurde als prozentuale Expression in Bezug auf die  $\beta$ -Actin Expression angegeben und als RXR $\alpha$ / $\beta$ ACT-Quotient dargestellt. Eine Reduktion des RXR $\alpha$ / $\beta$ ACT-Quotienten von 1,0 der Kontrolle auf 0,39 der mit 9-*cis*RA behandelten BeWo Zellen wurde ermittelt (Abbildung 27 b). Somit führten 10 nmol/ml 9-*cis*RA nach einer Inkubationszeit von 48h zu einer signifikanten ( $p=0.043$ ) Reduktion der RXR $\alpha$  Proteinexpression in BeWo Zellen (Abbildung 27 b).

Der Western Blot der RXR $\alpha$  Expression in JEG-3 Zellen ist in Abbildung 27 c dargestellt. In JEG-3 Zellen generierte RXR $\alpha$  eine Proteinbande bei einer molekularen Masse von 60 kDa. Die linke Bande, welche die RXR $\alpha$  Proteinexpression der Kontrolle repräsentiert, ist intensiver angefärbt als die rechte Bande, welche die RXR $\alpha$  Proteinexpression der mit 10 nmol/ml 9-*cis*RA und für 48h stimulierten BeWo Zellen darstellt (Abbildung 27 c). Mittels der quantitativen Bio-Rad Quantity One® Software (Bio-Rad Laboratories) konnte eine signifikante ( $p=0.028$ ) Reduktion der RXR $\alpha$  Expression in JEG-3 Zellen nach einer Inkubation mit 10 nmol/ml 9-*cis*RA für 48h detektiert werden (Abbildung 27 d). Die Anfärbungsintensität der RXR $\alpha$  Proteinbanden in stimulierten und unstimulierten JEG-3 Zellen, die als Fläche (mm<sup>2</sup>) angegeben ist, wurde gegenüber der  $\beta$ ACT Anfärbungsintensität normiert. Eine Abnahme des RXR $\alpha$ / $\beta$ ACT-Quotienten von 1,0 der Kontrolle auf 0,5 der mit 9-*cis*RA behandelten JEG-3 Zellen wurde ermittelt.



**Abbildung 27: Western Blot der RXRα Expression in BeWo und JEG-3 Zelllysaten** **a)** Die linke Bande des Western Blots repräsentiert die unstimulierten BeWo Zellen und die rechte Bande repräsentiert die mit 10 nmol/ml 9-cisRA und für 48h stimulierten BeWo Zellen. **c)** Die linke Bande repräsentiert die JEG-3 Kontrollen und die rechte Bande repräsentiert die JEG-3 Zellen, die mit 10 nmol/ml 9-cisRA für 48h stimuliert wurden. **b, d)** Die Quantifizierung der Western Blots wurde mit der Bio-Rad Quantity One® Software (Bio-Rad Laboratories) durchgeführt.

#### 4.1.3 RXRα – Quantitative Real-time Polymerase-Kettenreaktion (TaqMan®-PCR)

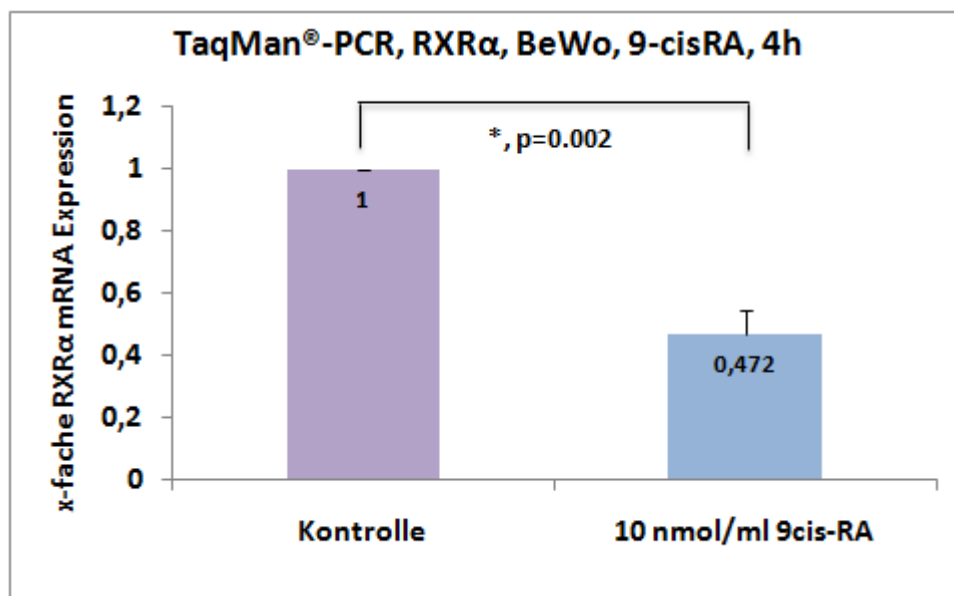
Mittels Immunzytochemie (4.1.1.2, 4.1.1.3) und Western Blot (4.1.2) konnte eine signifikante Reduktion der RXRα Proteinexpression in BeWo und JEG-3 Zellen induziert durch die Vitamin-A-Säure Derivate 9-cisRA und ATRA und das Prostaglandin 15d-J<sub>2</sub> demonstriert werden. Die Substanzen führten somit zu einer Abnahme der RXRα Expression auf Translationsebene. BeWo und JEG-3 Zellen wurden erneut mit 10 nmol/ml 9-cisRA und 15d-J<sub>2</sub> stimuliert und mittels quantitativer Real-time PCR (TaqMan®-PCR) analysiert, um den Effekt der Substanzen auf die Transkription von RXRα zu untersuchen.

#### 4.1.3.1 RXR $\alpha$ mRNA Expression in BeWo und JEG-3 Zellen

Die immunzytochemischen Ergebnisse der RXR $\alpha$  Expression in BeWo und JEG-3 Zellen konnten auf mRNA Ebene mit Hilfe der quantitativen TaqMan®-PCR verifiziert werden.

Die Behandlung von BeWo Zellen mit 10 nmol/ml 9-*cis*RA induzierte bei einer Inkubationsszeit von 4h eine signifikante ( $p=0.002$ ) Erniedrigung der RXR $\alpha$  mRNA Expression auf 47,2% im Vergleich zu den unstimulierten BeWo Zellen (100%) (Abbildung 28). Somit wurde die RXR $\alpha$  mRNA Expression durch 9-*cis*RA um über die Hälfte der initialen Menge reduziert. 10 nmol/ml der Substanz 15d-J<sub>2</sub> verursachten in BeWo Zellen nach einer Inkubationszeit von 4h ebenfalls eine signifikante ( $p=0.01$ ) Reduktion der RXR $\alpha$  mRNA von 100% auf 67,3% (Abbildung 29).

In JEG-3 Zellen führten 9-*cis*RA und 15d-J<sub>2</sub> bei einer Konzentration von 10 nmol/ml und nach einer 8-stündigen Inkubation zu einer signifikanten Erniedrigung der RXR $\alpha$  mRNA Expression. Die Substanz 9-*cis*RA reduzierte die RXR $\alpha$  mRNA Expression von 100% der unbehandelten Zellen auf 65,6% (Abbildung 30) und 15d-J<sub>2</sub> reduzierte die RXR $\alpha$  mRNA Expression auf 84,0% (Abbildung 31). Die Reduktion der RXR $\alpha$  mRNA Expression war in BeWo Zellen stärker ausgeprägt als in JEG-3 Zellen. In Übereinstimmung mit den immunzytochemischen Ergebnissen hatte 9-*cis*RA von den drei getesteten Substanzen die stärkste Auswirkung auf die Reduktion der RXR $\alpha$  mRNA Expression. Da die Abnahme der RXR $\alpha$  mRNA Expression in BeWo Zellen nach 4h und in JEG-3 Zellen erst nach 8h erfolgte, findet die RXR $\alpha$  mRNA Synthese in BeWo Zellen auf Grund einer unterschiedlichen Zeitkinetik vermutlich früher statt als in JEG-3 Zellen.



**Abbildung 28:** Quantitative Real-time PCR (TaqMan®-PCR) Auswertung der RXR $\alpha$  mRNA Expression in BeWo Zellen nach Inkubation mit 10 nmol/ml 9-*cis*RA für 4h. Signifikante Reduktion der RXR $\alpha$  mRNA Expression nach 4h durch 9-*cis*RA. Als Referenzgen (=Housekeeping-Gene) diente GAPDH.

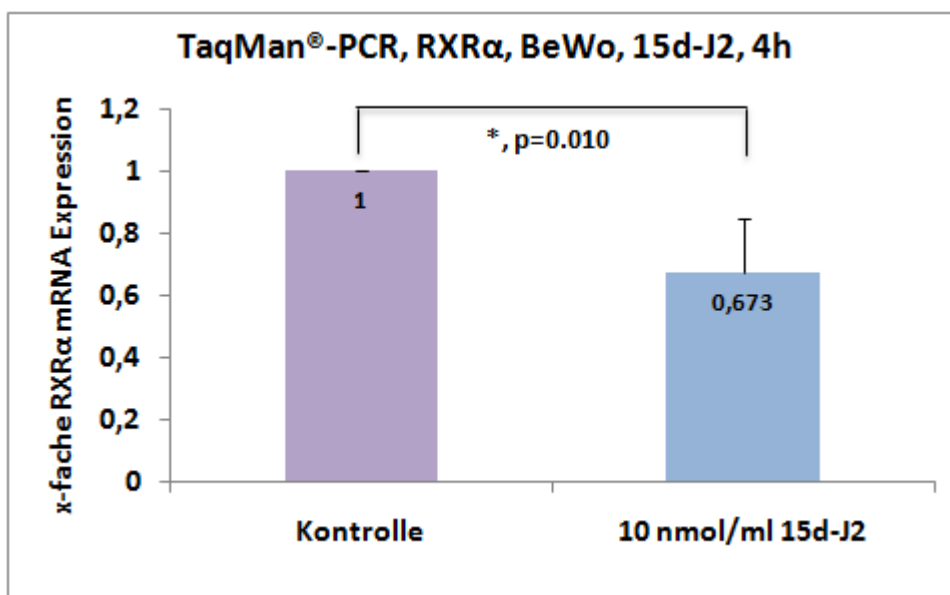


Abbildung 29: Quantitative Real-time PCR (TaqMan®-PCR) Auswertung der RXRα mRNA Expression in BeWo Zellen nach Inkubation mit 10 nmol/ml 15d-J<sub>2</sub> für 4h. Signifikante Reduktion der RXRα mRNA Expression nach 4h durch 15d-J<sub>2</sub>. Als Referenzgen (=Housekeeping-Gene) diente GAPDH.

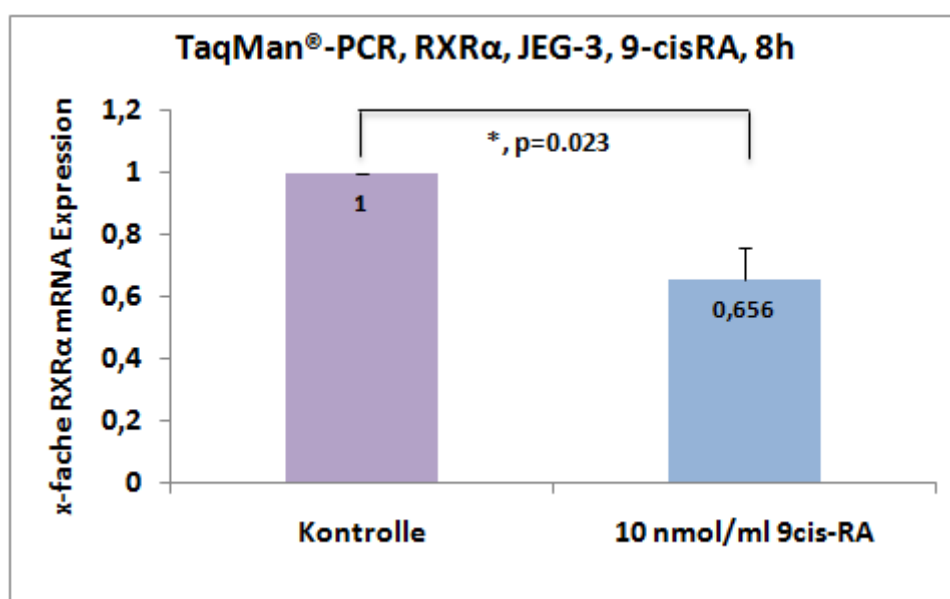
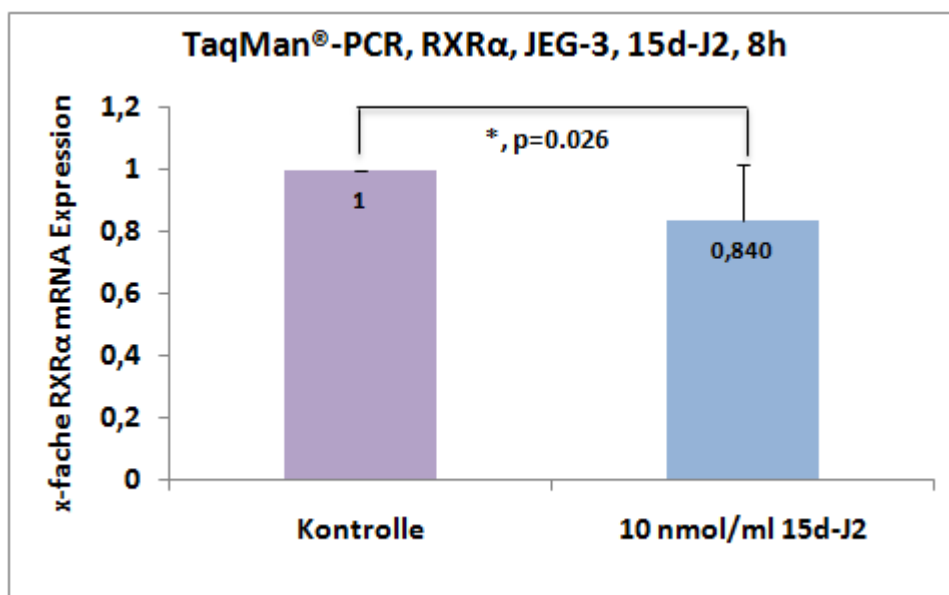


Abbildung 30: Quantitative Real-time PCR (TaqMan®-PCR) Auswertung der RXRα mRNA Expression in JEG-3 Zellen nach Stimulation mit 10 nmol/ml 9-cisRA für 8h. Signifikante Reduktion der RXRα mRNA Expression nach 8h durch 9-cisRA. Als Referenzgen (=Housekeeping-Gene) diente GAPDH.





**Abbildung 31: Quantitative Real-time PCR (TaqMan®-PCR) Auswertung der RXRα mRNA Expression in JEG-3 Zellen nach Stimulation mit 10 nmol/ml 15d-J<sub>2</sub> für 8h.** Signifikante Reduktion der RXRα mRNA Expression nach 8h durch 15d-J<sub>2</sub>. Als Referenzgen (=Housekeeping-Gene) diente GAPDH.

## 4.2 Regulation der Leptin Rezeptor Expression in BeWo und JEG-3 Zellen

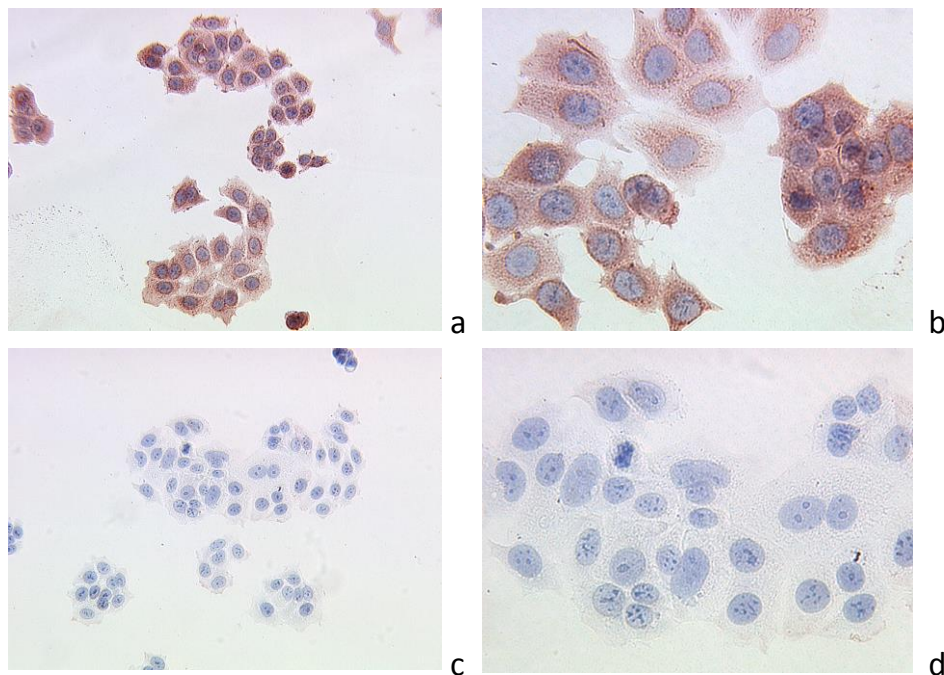
In Abortplazenten werden RXRα sowie der Leptin Rezeptor (ObR) vermehrt exprimiert. In Ergänzung zur Analyse der Regulation der RXRα Expression galt als weiteres Ziel dieser Studie die Untersuchung der Regulation von ObR in Trophoblastmodell-Zellen. BeWo und JEG-3 Zellen wurden mit 9-*cis*RA und 15d-J<sub>2</sub> stimuliert und die Expression von ObR in den genannten Zellen immunzytochemisch ausgewertet. Die Trophoblasttumorzellen wurden mit 10 nmol/ml der jeweiligen Substanzen stimuliert, da bei dieser Konzentration der stärkste Einfluss auf die RXRα Expression beobachtet werden konnte.

### 4.2.1 Leptin Rezeptor – Immunzytochemie

Die Immunzytochemie weist die ObR Expression in den Chorionkarzinomzellen auf Proteinebene nach. Wie für die Analyse von RXRα (siehe 4.1.1.1) wurden Positiv- und Negativkontrollen zum Ausschluss einer unspezifischen Anfärbung der untersuchten Zellen parallel durchgeführt.

#### 4.2.1.1 Leptin Rezeptor – Positiv- und Negativkontrollen

MCF-7 Zellen dienten, wie bereits in der immunzytochemischen Analyse der RXRα Proteinexpression, als Positivkontrolle für den Leptin Rezeptor (ObR), da MCF-7 Zellen ebenfalls ObR exprimieren [201] (Abbildung 32 a, b). Als Negativkontrolle wurde die Maus IgG Isotypen Kontrolle verwendet und auf MCF-7, BeWo und JEG-3 Zellen appliziert (Abbildung 32 c, d).

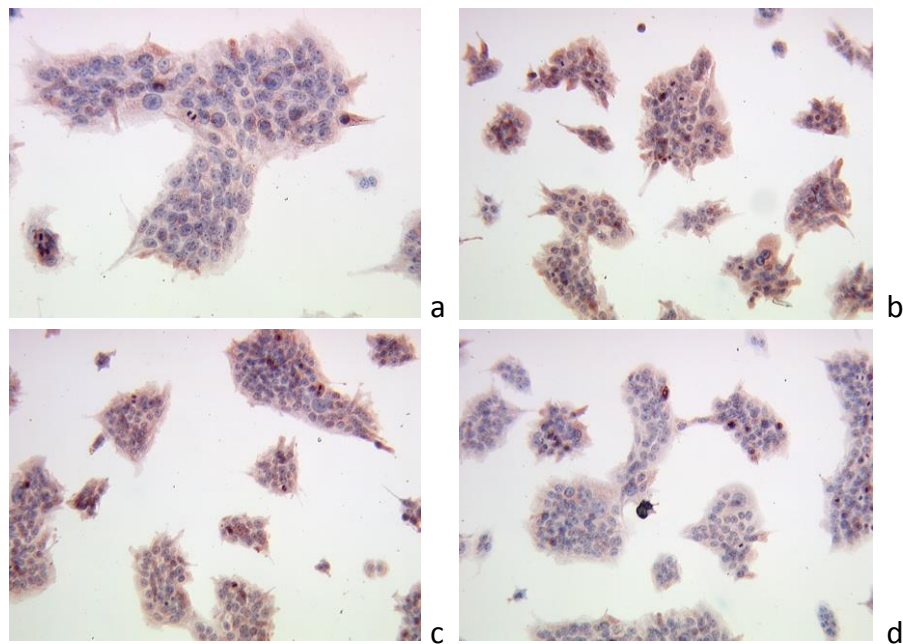


**Abbildung 32: Positiv- und Negativkontrollen von ObR** a) ObR Positivkontrolle an MCF-7-Zellen, Vergrößerung: x10 b) ObR Positivkontrolle an MCF-7-Zellen, x25 c) ObR Negativkontrolle an MCF-7 Zellen, Maus IgG Isotypen Kontrolle, x10 d) ObR Negativkontrolle an MCF-7 Zellen, Maus IgG Isotypen Kontrolle, x25. Endkonzentration ObR Positivkontrolle: 8,3 µg/ml. Endkonzentration von ObR Positiv- und Negativkontrolle: 8,3 µg/ml

#### 4.2.1.2 Leptin Rezeptor Expression in BeWo und JEG-3 Zellen

BeWo und JEG-3 Zellen wurden mit 10 nmol/ml 9-*cis*RA und 15d-J<sub>2</sub> für 24h und 48h stimuliert und mit dem monoklonalen Antikörper Anti-ObR gemäß dem Färbeprotokoll (siehe 3.2.1.2) immunzytochemisch ausgewertet. Da ObR ein membranständiger Rezeptor ist und die Zellen einen Monolayer auf den Objektträgern bilden, besitzen die ObR-exprimierenden Zellen in der immunzytochemischen Färbung unterschiedlich große Oberflächen. Die voneinander abweichende Anfärbung der Zellen erschwerte die Auswertung der immunzytochemischen Analyse des ObR Antigens.

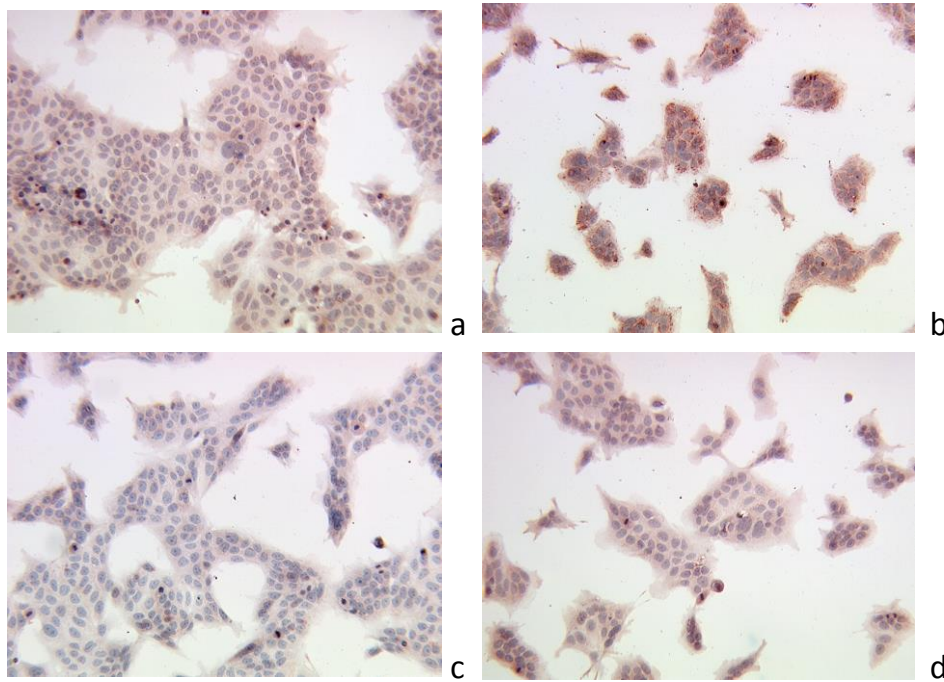
In Abbildung 33 ist eine variierende ObR Expression der mit 9-*cis*RA stimulierten BeWo Zellen zu erkennen. Es war sowohl eine vermehrte, verminderte sowie unveränderte ObR Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erkennbar. Da keine einheitliche Expressionsveränderung ersichtlich war, konnte die immunzytochemische Analyse nicht zur Auswertung der ObR Proteinexpression in BeWo Zellen herangezogen werden. Für die mit 10 nmol/ml 15d-J<sub>2</sub> stimulierten BeWo Zellen war kein Unterschied in der Anfärbung bzw. in der ObR Expression im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten.



**Abbildung 33: Digitale Aufnahme der immunzytochemischen Analyse der ObR Expression in BeWo Zellen nach Inkubation mit 10 nmol/ml 9-*cis*RA** a) BeWo Kontrolle, unstimuliert, 24h, Vergrößerung: x10. b,c,d) Inkubation von BeWo Zellen mit 10 nmol/ml 9-*cis*RA für 24h, x10.

In JEG-3 Zellen erwies sich die immunzytochemische Färbung der ObR Expression ebenfalls als schwierig. In sechs voneinander unabhängigen Färbungen der JEG-3 Zellen mit dem Primärantikörper Anti-ObR konnten stark voneinander abweichende Resultate der ObR Proteinexpression nach Behandlung mit 15d-J<sub>2</sub> und 9-*cis*RA nachgewiesen werden. Von den mit 10 nmol/ml 9-*cis*RA stimulierten JEG-3 Zellen ergaben drei voneinander unabhängige Auswertungen eine signifikante Zunahme der ObR Expression, während drei weitere Untersuchungen eine signifikante Abnahme der ObR Expression hervorriefen. In Abbildung 34 sind Beispiele der variierenden ObR Expression von den mit 10 nmol/ml 9-*cis*RA behandelten JEG-3 Zellen dargestellt. Die Beeinflussung der ObR Expression in JEG-3 Zellen durch 10 nmol/ml 15d-J<sub>2</sub> war in der Immunzytochemie ebenfalls nicht auswertbar (daher nicht dargestellt).

Die immunzytochemische Analyse kann somit nicht als Nachweismethode der ObR Proteinexpression in Trophoblasttumorzellen nicht angewendet werden. Aufgrund der indifferenten immunzytochemischen Ergebnisse der ObR Expression in stimulierten BeWo und JEG-3 Zellen war es notwendig, eine alternative Nachweismethode der ObR Expression auf Proteinebene anzuwenden. Hierzu diente der Dot Blot, der mit Hilfe eines Graphikprogramms eine quantitative Auswertung der ObR Proteinexpression ermöglicht.



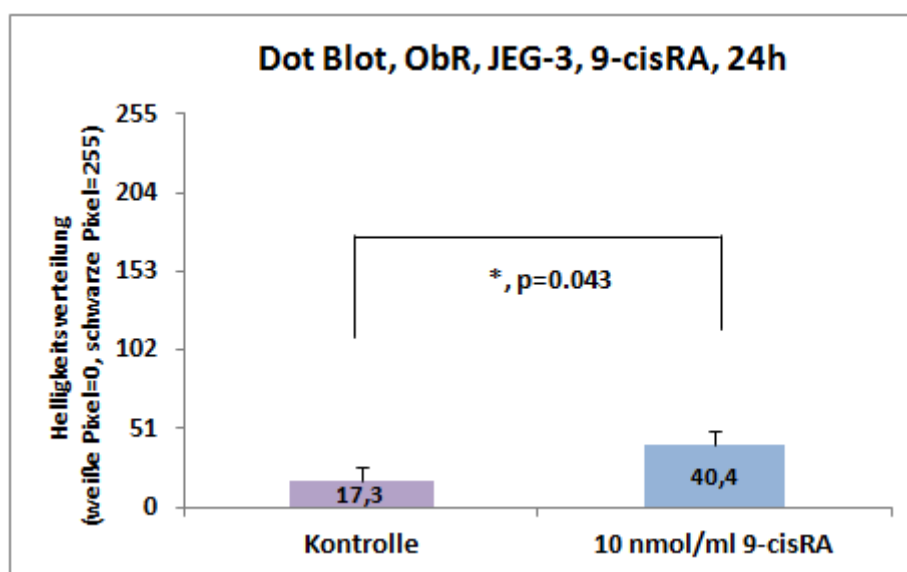
**Abbildung 34: Digitale Aufnahme der immunzytochemischen Analyse der ObR Expression in JEG-3 Zellen nach Inkubation mit 10 nmol/ml 9-cisRA a)** JEG Kontrolle, unstimuliert, 24h, Vergrößerung: x10. **b,c,d)** Inkubation von JEG-3 mit 10 nmol/ml 9-cisRA für 24h, x10.

#### 4.2.2 Leptin Rezeptor – Dot Blot

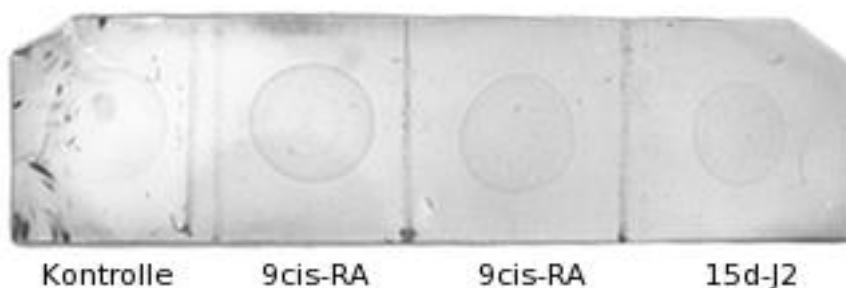
Für den Nachweis von ObR im Dot Blot wurden zuvor JEG-3 und BeWo Zellen für 24h mit 10 nmol/ml 9-cisRA und 15d-J<sub>2</sub> stimuliert (3.2.2.1). Daraufhin wurde die Proteinmenge der stimulierten Zellen und der Kontrollen mittels Bradford Assay zur Berechnung der notwendigen Verdünnungen der Proben mit dem Zelllyse-Puffer bestimmt (siehe 3.2.2.2). Zur Auswertung der Dot Blots diente das quantitative Gimp® Graphik-Programms. Die verwendeten Werkzeuge und die Auswertungsmethode des Programms Gimp® sind in Abbildung 38 als Screenshot dargestellt. Die Punkte im Dot Blot wurden mit einem epiliptischen Auswahlwerkzeug markiert. Anhand eines Gimp® Histogramms wurde die Helligkeitsverteilung der einzelnen Dots auf einer Grauskala als sog. Durchschnittswert dargestellt. Die Skala rangiert von 0 – welches durch schwarze Pixel kodiert wird – bis zu einem Zahlenwert von 255 – dieser wird durch weiße Pixel kodiert. Umso höher der angegebene Durchschnittswert der Grauskala ist, desto niedriger ist die ObR Expression. Somit konnten die Helligkeitsintensitäten der Kontroll- und der stimulierten Felder der Dot Blots, die die ObR Expression widerspiegeln, quantitativ verglichen werden. In Abbildung 35 und Abbildung 37 sind die Helligkeitsverteilungen der Felder im Dot Blot invertiert dargestellt (0=weiß, 255=schwarz), um graphisch zu demonstrieren, dass ein erhöhter Zahlenwert eine vermehrte ObR Expression repräsentiert. In Abbildung 36 ist zu erkennen, dass die Punkte der Kontrollen heller sind als die mit 9-cisRA stimulierten JEG-3 Zellen. Durch Verwendung des Gimp® Programms wurde diese Beobachtung validiert. Somit führten 10 nmol/ml 9-cisRA nach einer Inkubationszeit von 24h zu einer signifikanten

( $p=0.043$ ) Zunahme der ObR Proteinexpression in JEG-3 Zellen, wie dies aus Abbildung 35 ersichtlich ist. 15d-J<sub>2</sub> führte bei einer Konzentration von 10 nmol/ml und nach 24h in JEG-3 Zellen ebenfalls zu einer vermehrten Proteinexpression von ObR. Diese Erhöhung erwies sich jedoch als nicht signifikant.

Die ObR Proteinexpression in BeWo Zellen wurde ebenfalls mittels Dot Blot bestimmt. Hierbei führten 10 nmol/ml 9-*cis*RA nach 24h zu einer Erhöhung der ObR Proteinexpression im Dot Blot (Abbildung 37). Der Unterschied im Vergleich zur Kontrolle war jedoch nicht signifikant ( $p=0.068$ ). Das Prostaglandin 15d-J<sub>2</sub> wies im Dot Blot indifferente Ergebnisse der ObR Expression in BeWo Zellen auf und wurde deshalb nicht zur Auswertung herangezogen.



**Abbildung 35:** Dot Blot Auswertung der ObR Expression nach Inkubation von JEG-3 Zellen mit 10 nmol/ml 9-*cis*RA für 24h. Die Helligkeitsverteilung ist intervertiert dargestellt.



**Abbildung 36:** Darstellung Dot Blot von JEG-3 Zellen. Inkubation von JEG-3 Zellen mit 10 nmol/ml 9-*cis*RA und 15d-J<sub>2</sub> für 24h.



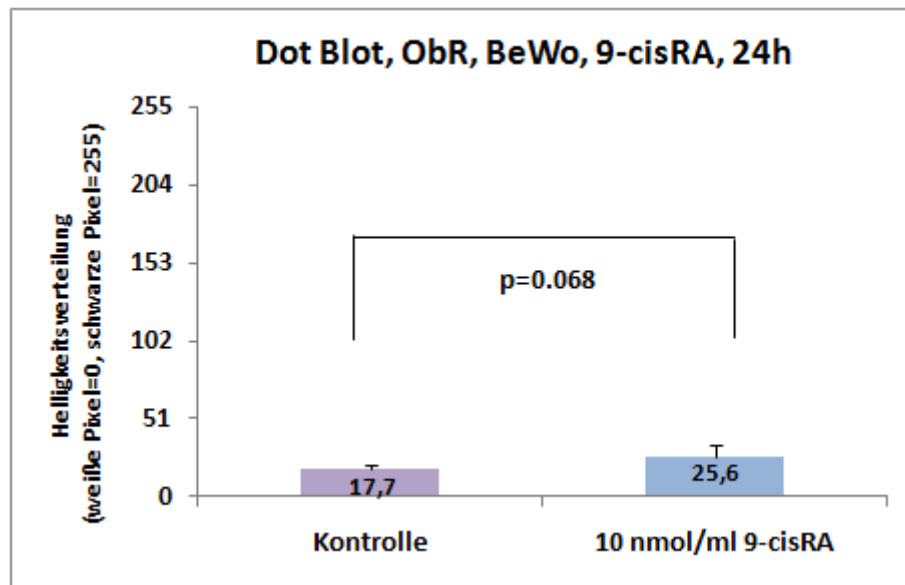


Abbildung 37: Dot Blot Auswertung der ObR Expression nach Inkubation von BeWo Zellen mit 10 nmol/ml 9-cisRA für 24h. Die Helligkeitsverteilung ist invertiert dargestellt.

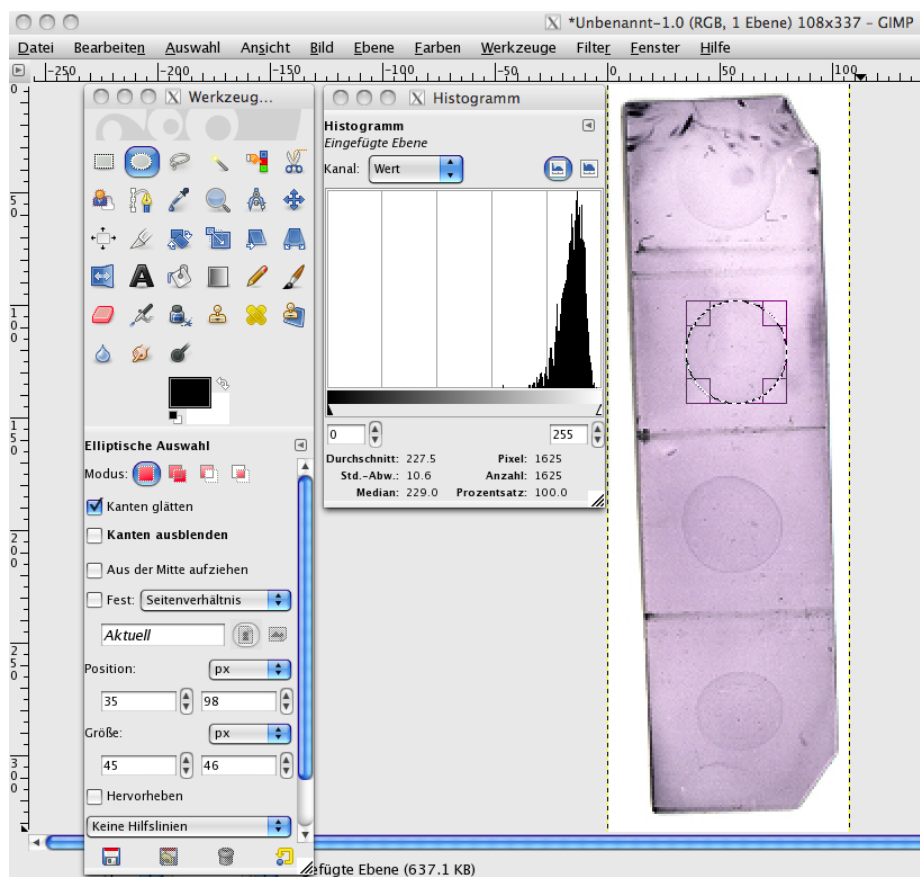


Abbildung 38: Darstellung (Screenshot) der Auswertung der Helligkeitsverteilung der Punkte im Dot Blot mittels des Gimp® Graphikprogramms.

#### 4.2.3 Leptin Rezeptor – Real-time Polymerase-Kettenreaktion (TaqMan®-PCR)

Zusätzlich zur Immunzytochemie und dem Dot Blot, die die ObR Expression auf Proteinebene darstellen, wurde die ObR Expression auf mRNA-Ebene mittels Real-time PCR (TaqMan®-PCR) analysiert. Diese weist die mRNA Expression von Antigenen auf transkriptionaler Ebene nach.

##### 4.2.3.1 Leptin Rezeptor mRNA Expression in JEG-3 und BeWo Zellen

In der quantitativen TaqMan®-PCR führten 10 nmol/ml 9-*cis*RA zu einer signifikanten ( $p=0.027$ ) Erhöhung der ObR mRNA Expression (Exon Boundary: 19-20) in JEG-3 Zellen. Das Exon Boundary 19-20 repräsentiert den intakten ObR im Abort. Die Hochregulierung erfolgte nach einer Inkubationszeit von 4h. Die Expression der ObR mRNA stieg von 100% der unbehandelten JEG-3 Zellen auf 180% der mit 10 nmol/ml 9-*cis*RA stimulierten Zellen (Abbildung 39). Somit wird ObR sowohl auf Proteinebene, wie mittels der Dot Blot Methode demonstriert werden konnte, als auch auf mRNA Ebene in JEG-3 Zellen produziert. 15d-J<sub>2</sub> hatte in der quantitativen TaqMan®-PCR keinen Einfluss auf die ObR mRNA Expression.

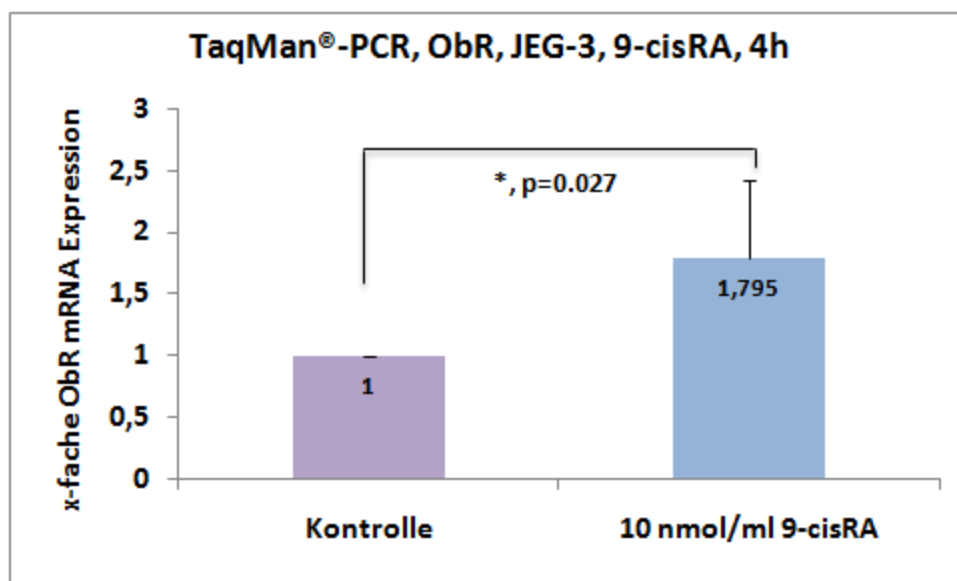
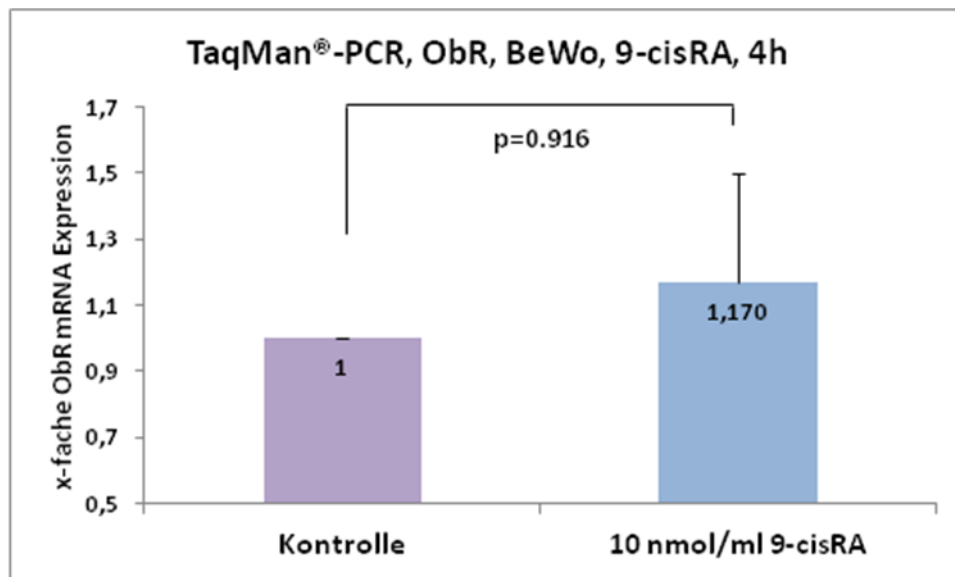


Abbildung 39: Quantitative Real-time PCR (TaqMan®-PCR) Auswertung der ObR mRNA Expression in JEG-3 Zellen nach Stimulation mit 10 nmol/ml 9-*cis*RA. Als Referenzgen (=Housekeeping-Gen) diente GAPDH.

Der Nachweis der mRNA Expression des intakten ObR in BeWo Zellen nach Stimulation mit 10 nmol/ml 9-*cis*RA für 4h wies ebenfalls eine verstärkte Expression der ObR mRNA auf, die jedoch keinen signifikanten Unterschied erbrachte ( $p=0.916$ ) (Abbildung 40). Sowohl im Dot Blot wie in der TaqMan®-PCR führte 9-*cis*RA somit zwar zu einer Erhöhung der ObR mRNA Expression in BeWo Zellen, die sich jedoch in beiden Methoden als nicht signifikant erwies. Nach Inkubation mit 10 nmol/ml 15d-J<sub>2</sub>

konnte keine signifikante Veränderung der ObR mRNA Expression in der TaqMan®-PCR festgestellt werden.



**Abbildung 40:** Quantitative Real-time PCR (TaqMan®-PCR) Auswertung der ObR mRNA Expression in BeWo Zellen nach Stimulation mit 10 nmol/ml 9-cisRA für 4h. Als Referenzgen (=Housekeeping-Gene) diente GAPDH.

### 4.3 Doppelimmunfluoreszenz

In vorherigen Studien von Minas und Jeschke *et al.* (2007) konnte eine Assoziation zwischen Aborten und einer vermehrten Expression von apoptotischen EVT identifiziert werden [191]. Ein weiteres Ziel der vorliegenden Studie beinhaltete daher, die Expression der zu untersuchenden Rezeptoren, RXR $\alpha$  und ObR, in Abortplazenten zu analysieren. Als Untersuchungsmethode wurde die Doppelimmunfluoreszenz verwendet.

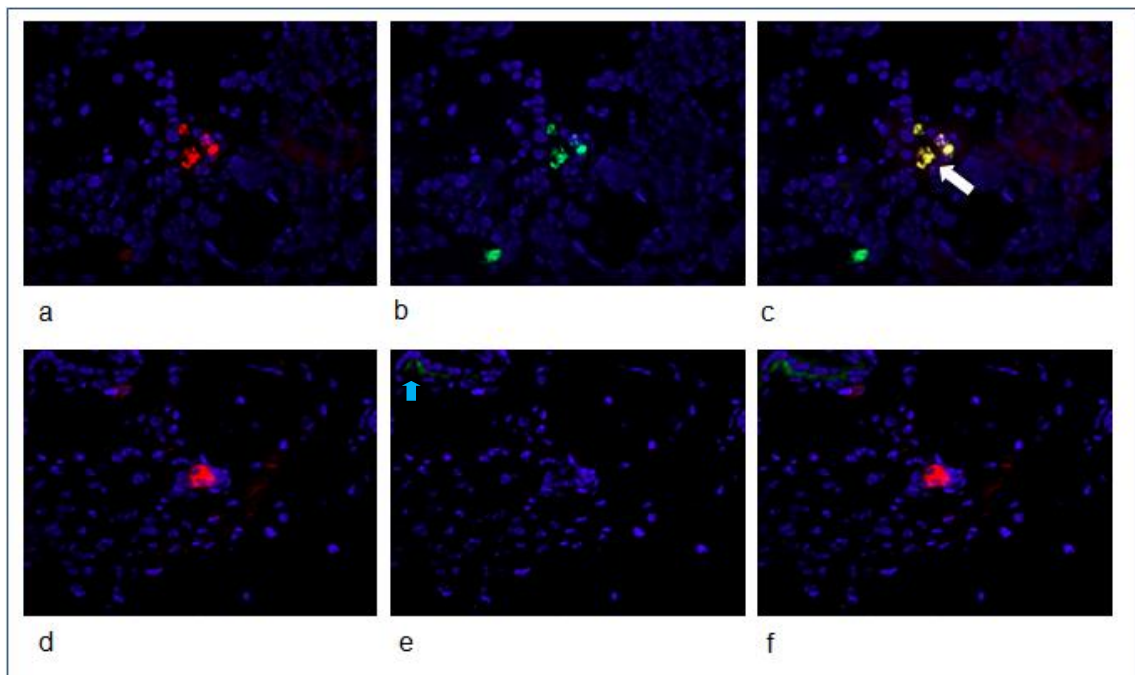
Der Apoptosemarker M30 CytoDEATH™ (M30) detektiert Apoptoseprozesse in epithelialen Zellen und Gewebe und erkennt Spaltprodukte von CK-18 [202]. Mittels Doppelimmunfluoreszenz konnte gezeigt werden, dass die interstitiellen EVT der Abortplazenten aus dem 1. Trimenon RXR $\alpha$  bzw. ObR exprimieren. Diese sind jeweils mit dem Sekundärantikörper Cy-3 markiert und rot dargestellt (Abbildung 41 a und Abbildung 42 a). Dieselben EVT exprimieren zusätzlich den Apoptosemarker M30, der mit Cy-2 markiert und grün angefärbt ist (Abbildung 41 b und Abbildung 42 b). Die Dreifachfilterung zeigt eine simultane Expression von M30 und RXR $\alpha$  bzw. M30 und ObR in EVT von Abortplazenten (Abbildung 41 c und Abbildung 42 c). Die Co-Expressionen sind durch die Fusion des grünen und roten Farbstoffes als gelbe Anfärbung erkennbar.

EVT von Plazenten legal induzierter Schwangerschaftsabbrüche exprimieren ebenfalls RXR $\alpha$  (Abbildung 41 d und Abbildung 42 d). Sie sind mit dem Sekundärantikörper Cy-3 markiert und rot dargestellt. Einige der EVT von Interruptio Plazenten sind grün

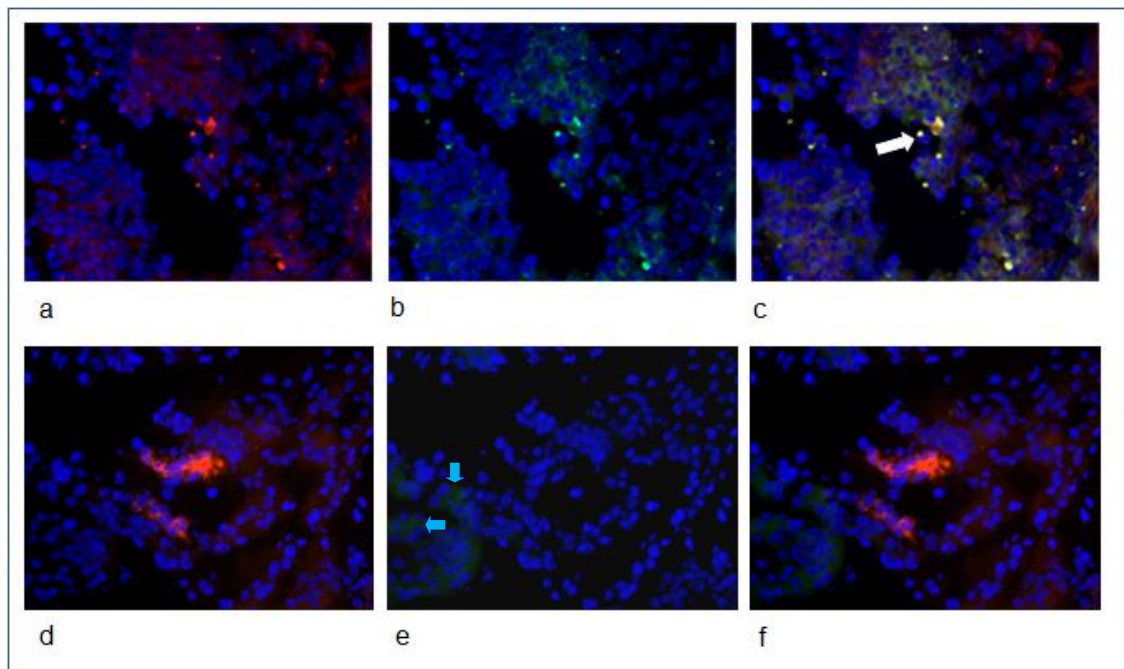


dargestellt und exprimieren den Apoptosemarker M30 (hellblauer Pfeil in Abbildung 41 e und Abbildung 42 e). In der Dreifachfilterung der Plazenten konnte keine simultane Expression von M30 und RXR $\alpha$  bzw. M30 und ObR detektiert werden. Somit sind die EVT von Plazenten normaler Schwangerschaften, die RXR $\alpha$  bzw. ObR exprimieren, nicht apoptotisch.

Zusammenfassend exprimieren apoptotische interstitielle EVT die Rezeptoren RXR $\alpha$  und ObR. Die blaue Anfärbung der Zellkerne resultiert aus dem Dapi enthaltenden Eindeckmedium. Dieses bindet selektiv an die DNA.



**Abbildung 41: Doppelimmunfluoreszenz-Färbung mit den Primärantikörpern M30-CytoDEATH™ (M30) und dem polyklonalen Anti-RXR $\alpha$**  **a)** RXR $\alpha$  ist mit dem Cy-3-Sekundärantikörper markiert und rot angefärbt. RXR $\alpha$  wird von EVT in Abortplazenten exprimiert. **b)** Die grüne Anfärbung repräsentiert den Apoptosemarker M30, der mit dem Cy-2 Antikörper markiert ist. **c)** Die Dreifachfilterung zeigt eine simultane Expression von M30 und RXR $\alpha$  in EVT von Abortplazenten. Die Co-Expression ist durch den weißen Pfeil gekennzeichnet. **d)** RXR $\alpha$  wird von EVT in Plazenten normaler Schwangerschaften exprimiert und ist rot angefärbt. **e)** Der grün markierte M30 Antikörper wird von einigen EVT in Interruptio-Plazenten exprimiert (hellblauer Pfeil). In EVT von Interruptio Plazenten kann keine simultane Expression von RXR $\alpha$  und M30 detektiert werden. Die Fluoreszenzbilder wurden bei einer x40 Vergrößerung aufgenommen.



**Abbildung 42: Doppelimmunfluoreszenz-Färbung mit den Primärantikörpern M30-CytoDEATH™ (M30) und des polyklonalen Anti-ObR** **a)** ObR ist mit dem Cy-3-Sekundäntikörper markiert und rot angefärbt. RXR $\alpha$  wird von EVT in Abortplazenten exprimiert. **b)** Die grüne Anfärbung repräsentiert den Apoptosemarker M30, der mit dem Cy-2 Antikörper markiert ist. **c)** Die Dreifachfilterung zeigt eine simultane Expression von M30 und ObR in EVT von Abortplazenten. Die Co-Expression ist durch den weißen Pfeil gekennzeichnet. **d)** ObR wird von EVT in Plazenten normaler Schwangerschaften exprimiert und ist rot angefärbt. **e)** Der grün markierte M30 Antikörper wird von einigen EVT in Interruptio-Plazenten exprimiert (hellblauer Pfeil). In EVT von Plazenten normaler Schwangerschaften kann keine simultane Expression von ObR und M30 detektiert werden. Die Fluoreszenzbilder wurden bei einer x40 Vergrößerung aufgenommen.

## 5 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Regulation der Rezeptoren RXR $\alpha$  und ObR zu untersuchen und deren Rolle bei den Signaltransduktionen in Abortprozessen zu analysieren. Wir konnten zeigen, dass die Retinsäuren 9-*cis*RA und ATRA eine signifikante Abnahme der RXR $\alpha$  Expression in den Chorionkarzinomzelllinien BeWo und JEG-3 induzierten. Dies konnte mittels Immunzytochemie, Western Blot sowie der quantitativen Real-time PCR (Taqman®-PCR) demonstriert werden. Des Weiteren induzierten die Retinsäuren in der Immunzytochemie eine signifikante Reduktion der RXR $\alpha$  Expression in humanen villösen Trophoblasten (HVT). Der PPAR $\gamma$ -Agonist 15d-J<sub>2</sub> führte in der Immunzytochemie zu einer Reduktion der RXR $\alpha$  Expression in HVT und sowohl in der Immunzytochemie als auch in der Taqman®-PCR zu einer signifikanten Abnahme der RXR $\alpha$  Expression in BeWo und JEG-3 Zellen. Zusätzlich konnte eine signifikante Zunahme der ObR Expression induziert durch 9-*cis*RA in JEG-3 Zellen auf Protein- und mRNA-Ebene beobachtet werden. Mittels Doppelimmunfluoreszenz wurde eine simultane Expression der Rezeptoren RXR $\alpha$  bzw. ObR und dem Apoptosemarker M30 CytoDEATH™ in EVT von Ersttrimester-Abortplazenten detektiert. In EVT von Plazenten gesunder Schwangerschaften konnte keine Co-Expression von M30 und RXR $\alpha$  bzw. ObR nachgewiesen werden.

In Abortplazenten weisen VT und interstitielle EVT eine signifikante Erhöhung der RXR $\alpha$  Expression im Vergleich zu Plazenten normaler Schwangerschaften auf [125]. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Substanzen 9-*cis*RA, ATRA und 15d-J<sub>2</sub> auf die Expression des nukleären Rezeptors RXR $\alpha$  in BeWo und JEG-3 und in HVT analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass bei einer Konzentration von 10 nmol/ml die Retinoide und der PPAR $\gamma$ -Agonist zu einer signifikanten Reduktion der RXR $\alpha$  Expression dieser Zelllinien führten. Dies konnte sowohl auf Proteinebene in der Immunzytochemie und im Western Blot sowie auf mRNA-Ebene mit Hilfe der Taqman®-PCR demonstriert werden. Daraus lässt sich ableiten, dass 9-*cis*RA, ATRA und 15d-J<sub>2</sub> die RXR $\alpha$  Expression auf transkriptionaler und translationaler Ebene beeinflussen [197]. Nach Stimulation der Chorionkarzinomzellen mit einer geringeren Konzentration der Liganden (1 nmol/ml) führte lediglich 9-*cis*RA sowohl nach 24h wie nach 48h zu einer signifikanten Erniedrigung der RXR $\alpha$  Proteinexpression. ATRA hatte in der Immunzytochemie bei einer Konzentration von 1 nmol/ml einen geringeren Einfluss auf die RXR $\alpha$  Reduktion als bei einer Konzentration von 10 nmol/ml. Für das Prostaglandin-Derivat 15d-J<sub>2</sub> war bei einer Konzentration von 1 nmol/ml kein Einfluss auf das RXR $\alpha$ -Vorkommen auf Proteinebene nachweisbar. Insgesamt führte eine verlängerte Inkubationszeit (48h im Vergleich zu 24h) der Chorionkarzinomzellen mit den Substanzen in Kombination mit einer erhöhten Konzentration dieser (10 nmol/ml im Vergleich zu 1 nmol/ml) zu einer stärkeren Erniedrigung der RXR $\alpha$  Expression.

Daraus schlussfolgern wir, dass die Gen-Transkription von RXR $\alpha$  in Chorionkarzinomzellen und HVT abhängig von der Expositionszeit und der Konzentration der Liganden ist.

Ein zusätzlicher Ansatz bestand in der Untersuchung der ObR Expression in BeWo und JEG-3 Zellen nach Stimulation mit 10 nmol/ml 9-*cis*RA und 15d-J<sub>2</sub>. Aus vorherigen Studien ist bekannt, dass die ObR Expression in EVT und in glandulär epithelialen Zellen der Dezidua von Abortplazenten signifikant erhöht ist [174]. In VT von Aborten ist die ObR Expression ebenfalls gegenüber normaler Schwangerschaften erhöht, jedoch ist dieser Unterschied nicht signifikant. Im Rahmen der vorliegenden Studie induzierte 9-*cis*RA bei einer Konzentration von 10 nmol/ml eine signifikante Erhöhung der ObR Expression in JEG-3 Zellen. Dies wurde auf Proteinebene mittels des Dotblot-Verfahrens und auf mRNA Ebene via Taqman®-PCR nachgewiesen. In BeWo Zellen führte 9-*cis*RA ebenfalls zu einer Zunahme der ObR Protein- und mRNA-Expression, die sich aber als nicht signifikant erwies. Für 15d-J<sub>2</sub> konnte weder mittels der Dotblot Analyse noch in der Taqman®-PCR ein signifikanter Effekt auf die ObR Expression in BeWo und JEG-3 Zellen festgestellt werden.

Eine vermehrte Anzahl an apoptotischen EVT ist in Plazenten von Aborten beschrieben [191]. Zusätzlich weisen EVT in Abortplazenten im Vergleich zu EVT in Plazenten normaler Schwangerschaften eine vermehrte Expression des Rezeptors RXR $\alpha$  auf [125]. In der vorangehenden Arbeit nahmen Minas und Jeschke *et al.* (2007) an, dass die Zeitspanne zwischen der Formalinfixierung bzw. dem Einfrieren des Gewebes und dem Eintreten des Abortes zu keiner zusätzlichen Zunahme von apoptotischen EVT führt [191]. Wenn die Apoptose von EVT aufgrund des Gewebeabbaus erfolgte, wäre auch in den Kontroll-Plazenten eine vermehrte Anzahl an apoptotischen EVT detektiert worden, da die Gewebegewinnung der Abort- und Kontroll-Plazenten identisch verlief [191]. Ein Ziel dieser Arbeit beinhaltete die Analyse der Expression von RXR $\alpha$  und ObR in apoptotischen EVT. Die Expression der zwei untersuchten Rezeptoren, RXR $\alpha$  und ObR, wurde zusammen mit dem Apoptosemarker CytoDEATH™ (M30) in EVT von Abortplazenten aus dem 1. Trimenon im Vergleich zu deren Expression in EVT von Plazenten gesunder Schwangerschaften bestimmt. Eine simultane Expression von RXR $\alpha$  und M30 bzw. ObR und M30 in EVT war feststellbar wohingegen in den Plazenten normaler Schwangerschaften keine Co-Expression nachzuweisen war.

Eine Liganden-vermittelte Reduktion der RXR $\alpha$  Expression in Chorionkarzinomzellen und humanen villösen Trophoblasten konnte in der vorliegenden Studie beobachtet werden. Lattuada *et al.* (2007) haben beschrieben, dass ein vermehrtes Vorkommen von RXR $\alpha$  die Sensitivität seiner Liganden, der pro-apoptotischen Retinsäuren, steigert und somit die Transkription der Gene, die in Apoptoseprozesse involviert sind, induziert [203]. Der Mechanismus der

Apoptoseinduktion ist relevant für die Therapie von Tumoren [186]. Eine Inhibierung der RXR $\alpha$  Expression könnte dem nukleären Rezeptor somit dazu dienen, die pro-apoptotische Unterdrückung der Retinoide [62] und des Prostaglandins [113] *in vivo* zu verhindern [197]. Dieses Phänomen wurde bereits in neutrophilen Granulozyten beschrieben, wo eine verminderte Expression von RXR $\alpha$  die Entwicklung der Granulozyten fördert [204]. Da RXR $\alpha$  vermehrt in apoptotischen EVT vorkommt, kann angenommen werden, dass eine Liganden-abhängige Reduktion von RXR $\alpha$  als Schutz vor Apoptose in Trophoblasten dient [197]. Aufgrund der erhöhten RXR $\alpha$  Expression im Abortgewebe reagieren HVT wahrscheinlich mit einer RXR $\alpha$  Abnahme, um einem spontanen Abort in der Frühschwangerschaft entgegenzusteuern [197]. In der durchgeführten Analyse haben die Retinoide einen stärkeren Einfluss auf die RXR $\alpha$ -Inhibierung gezeigt als der PPAR $\gamma$ -Agonist 15d-J<sub>2</sub>. Als zukünftiges Ziel gilt, mittels Tierversuche die Signalwege der Retinoide näher zu untersuchen und zu überprüfen, ob eine verringerte RXR $\alpha$  Expression in Trophoblasten die Inzidenz von Frühaborten beeinflusst und ob RXR $\alpha$  einen potentiellen Zielrezeptor im Abortgeschehen darstellt [197].

Da heterodimere Komplexe und RXR $\alpha$  sich gegenseitig antagonisieren können und RXR $\alpha$  in diverse physiologische Cross-Talks, wie z.B. immunologische und inflammatorische Prozesse, involviert ist, kann die Beeinflussung von RXR $\alpha$  jedoch weitreichende Nebenwirkungen haben [24]. Daher muss die RXR $\alpha$  Expression so reguliert werden, dass weiterhin die Funktionalität der physiologischen Signaltransduktionswege gewährleistet ist. Die Expression von RXR $\alpha$  darf unter keinen Umständen komplett inhibiert werden, da RXR $\alpha$ -null Mutationen letal für den Embryo in Mausversuchen sind [66, 67].

In Übereinstimmung mit den vorliegenden Ergebnissen haben Nomura *et al.* (1999) mittels Western Blot demonstrieren können, dass 1  $\mu$ M 9-*cis*RA die RXR $\alpha$  Proteinexpression in JEG-3 Zellen nach 24h signifikant reduziert [205]. Sie erklärten sich die RXR $\alpha$  Abnahme mit einem vermehrten Abbau des RXR $\alpha$  Proteins durch Enzyme wie die lysosomale Cathepsin L-Typ Protease. Dieser Abbau wird durch die Retinsäure 9-*cis*RA beschleunigt. Zudem begründeten sie die Reduktion der RXR $\alpha$  Expression mit der Vermutung, dass 9-*cis*RA die Verlagerung von RXR $\alpha$  aus dem Nukleus in das Zytoplasma fördert. Im Widerspruch dazu steht, dass in der vorliegenden immunzytochemischen Analyse keine Anfärbung des Zytoplasmas durch den Anti-RXR $\alpha$  Antikörper, zum Nachweis der Dislokation des Rezeptors in das Zytoplasma, nachgewiesen werden konnte. Die nahe liegende Erkenntnis daraus ist, dass RXR $\alpha$  mit hoher Wahrscheinlichkeit während der Proliferation über die Response Elemente (RXRE) an die DNA gebunden wird und die RXR $\alpha$  Konzentration in Folge unverändert bleibt [197]. Da sich die DNA Menge gleichzeitig verdoppelt, sinkt das Verhältnis von an DNA gebundenem RXR $\alpha$  [197]. Daraus schlussfolgernd könnte in

der immunzytochemischen Färbung eine verminderte Expression von RXR $\alpha$  resultieren [197].

Die Hypothese von Nomura *et al.* (1999), dass 9-*cis*RA den Abbau des RXR $\alpha$  Proteins beschleunigt, wurde durch die Arbeitsgruppe von Boudjelal *et al.* (2002) verifiziert [206]. In ihrer Untersuchung ermittelten sie, dass 1  $\mu$ M 9-*cis*RA sowie 1  $\mu$ M ATRA eine signifikante Reduktion der RXR $\alpha$  Proteinexpression in immortalisierten humanen Keratinozyten (HaCaT Zellen) induzierten [206]. Boudjelal und Kollegen waren der Ansicht, dass die Liganden-induzierte Abnahme der RXR $\alpha$  Expression durch einen Proteasomen Degradations-Signalweg, der Proteine fragmentiert, vermittelt wird. Somit führt die Bindung des Liganden an RXR $\alpha$  zum einen zur funktionellen Aktivierung des Rezeptors und zum anderen zur Limitierung seiner Expression [206]. Die Reduktion der RXR $\alpha$  Expression, die der Ligandenbindung folgt, trägt folglich zu einem verminderten Ansprechen der Zellen auf Retinoide bei [206]. Der Retinsäure-abhängige Abbau des Rezeptors führt zur Abschwächung der Rezeptor-vermittelten Genexpression [92] und beeinflusst dadurch Abläufe wie z.B. Homöostase, Differenzierung, fetale Entwicklung und Onkogenese [207]. Eine Liganden-induzierte Rezeptorendegradation, vermittelt über den Proteasomen Signalweg, wurde für weitere Mitglieder der nukleären Rezeptoren Superfamilie beschrieben: Nawaz *et al.* (1999) zeigten auf, dass Östrogen über einen Proteasomen Signalweg zum Abbau des Östrogenrezeptors führt und damit die transkriptionelle Aktivität des Östrogenrezeptors reduziert [208]. Der Thyroidhormon-Rezeptor wird ebenfalls nach Bindung der Schilddrüsenhormone über einen Proteasomen-vermittelten Signalweg abgebaut [209]. Somit spielt der Proteasomen-Signalweg eine entscheidende Rolle in der Regulation der Aktivität nukleärer Rezeptoren [210].

Der Einfluss von Retinoiden und PPAR $\gamma$ -Agonisten auf die RXR $\alpha$  Expression weist eine Abhängigkeit von der zu untersuchenden Gewebeart auf [197]. In 3T3-L1 Maus Adipozyten konnte die Arbeitsgruppe Hollung *et al.* (2004) eine signifikante Erhöhung der RXR $\alpha$  mRNA Expression nach Inkubation mit 1  $\mu$ M bzw. 10  $\mu$ M ATRA feststellen [211]. Krskova-Tybitanclova *et al.* (2008) konnten ebenfalls eine Erhöhung der RXR $\alpha$  Expression im Fettgewebe von Ratten nach Inkubation des Gewebes mit 13-*cis*RA detektieren [212]. Dies zeigt, dass Retinsäuren unterschiedliche Effekte auf die Expression von RXR $\alpha$  in Fettgewebe und Adipozyten im Vergleich zur RXR $\alpha$  Expression in Chorionkarzinomzellen und Trophoblasten haben, welche Untersuchungsgegenstand der durchgeführten Studie waren. Da synthetische RXR Liganden in der Lage sind, die Adipogenese zu fördern und die RXR Expression während der Adipozyten Differenzierung zu erhöhen, besteht die Möglichkeit, dass Retinoide zu einer Erhöhung der RXR $\alpha$  Expression in Adipozyten führen [213]. Schlussfolgernd ist die Wirkung von Retinoiden auf die Expression nukleärer

Rezeptoren abhängig von der Konzentration, Inkubationszeit, Gewebe- und Speziesart [211].

Obwohl 9-*cis*RA und ATRA beides Retinsäure-Isoformen sind, besitzen sie unterschiedliche Bindungsfähigkeiten zu nukleären Rezeptoren. Der Rezeptor RAR wird durch 9-*cis*RA und ATRA aktiviert, RXR hingegen nur durch 9-*cis*RA [59, 214]. In der vorliegenden Arbeit wurde nicht nur ein Effekt von 9-*cis*RA, sondern ebenfalls ein Einfluss der Liganden ATRA und 15d-J<sub>2</sub> auf die RXR $\alpha$  Expression nachgewiesen. Obwohl 9-*cis*RA vermutlich der einzig aktive Ligand von RXR ist, haben bereits andere Arbeitsgruppen zeigen können, dass außer 9-*cis*RA noch weitere Liganden in der Lage sind, RXR zu beeinflussen. Mangelsdorf *et al.* (1992) haben herausgefunden, dass zwar 9-*cis*RA einen 40-fach stärkeren Effekt als ATRA auf die RXR Expression hat, ATRA aber ebenfalls zur Aktivierung von RXR beitragen kann [55]. Ein Ansatz zur Erläuterung des Einflusses von ATRA auf die RXR $\alpha$  Expression ist, dass sich ATRA eventuell während der Inkubationszeit, in der vorliegenden Studie exemplarisch in der Zeitspanne zwischen 24h und 48h, zu seinem Isomer 9-*cis*RA umwandelt und damit die Eigenschaften von 9-*cis*RA übernimmt [59]. Die Hypothese der Isomerisierung wurde ebenfalls von Gouibourdanche *et al.* (1998) aufgestellt: Sie fanden heraus, dass sowohl 9-*cis*RA wie auch ATRA in JEG-3 Zellen die hCG Sekretion fördern [195]. Da für 9-*cis*RA dieser Effekt bereits nach 24-stündiger und für ATRA nach 48-stündiger Inkubation von JEG-3 erkennbar war, vermuteten Gouibourdanche und Kollegen, dass die Umwandlung von ATRA zu 9-*cis*RA nach einer 2-tägigen Exposition von JEG-3 Zellen mit ATRA erfolgt [195]. Es ist anzunehmen, dass die Konversion von ATRA zu 9-*cis*RA durch eine spezifische Isomerase entsteht [215]. Durch Bildung eines heterodimeren Komplexes von RXR $\alpha$  und PPAR $\gamma$  kann das Prostaglandin 15d-J<sub>2</sub> wahrscheinlich Einfluss auf die RXR $\alpha$  Expression in Chorionkarzinomzellen und humanen villösen Trophoblasten nehmen. Voraussichtlich beruht deren Interaktion auf einem indirekten Mechanismus der PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$  Aktivierung [216]. Shulman und Kollegen (2004) behaupteten, dass RXR $\alpha$  und PPAR $\gamma$  einen „toleranten“ heterodimeren Komplex formen, der durch RXR $\alpha$ - oder PPAR $\gamma$ -Liganden aktiviert werden kann [217].

Weiterhin konnte in der vorliegenden Arbeit eine Co-Expression des Apoptosemarkers M30 CytoDEATH™ (M30) mit RXR $\alpha$  bzw. M30 und ObR in EVT von Ersttrimester Abortplazenten aufgezeigt werden. Somit werden die Rezeptoren ObR und RXR $\alpha$  von apoptotischen Trophoblasten exprimiert. Die Erkenntnis über die Expression von RXR $\alpha$  und ObR im Abortgewebe und die Regulation der Rezeptoren in Trophoblasten und Chorionkarzinomzellen ermöglicht einen Vergleich der beiden Rezeptoren miteinander. Apoptotische Zellen weisen eine vermehrte Expression von ObR und RXR $\alpha$  auf [197]. Gesunde bzw. nicht-apoptotische Zellen weisen ebenfalls eine erhöhte Expression von ObR auf, hingegen ist die Expression von RXR $\alpha$  reduziert

[197]. Diese Erkenntnis lässt vermuten, dass RXR $\alpha$  eine entscheidende Rolle in der Apoptose-Induktion einnimmt [197]. Eine verminderte RXR $\alpha$  Expression ist wünschenswert, um die Apoptose von EVT, wie sie in Abortplazenten vorzufinden ist, zu verhindern [197]. Eine alleinige Zunahme der ObR Expression induziert vermutlich keinen apoptotischen Zustand. Damit ObR Apoptose induzieren kann, müsste die Zunahme der ObR Expression in Kombination mit einer Erhöhung der RXR $\alpha$  Expression einhergehen. Ein darauf aufbauendes Ziel zukünftiger Untersuchungen ist die Identifizierung natürlicher Liganden, die die Expression von RXR $\alpha$  erhöhen und damit pro-apoptotische Auswirkungen haben [197]. Die Erkenntnis über solche Liganden kann zu einem verbesserten Verständnis über die Regulation von RXR $\alpha$  im Apoptose- bzw. im Abortgeschehen beitragen [197].

Zusätzlich zu RXR $\alpha$  wurde der Zytokin Rezeptor ObR in den dargestellten Versuchen untersucht. Es konnte demonstriert werden, dass die mRNA Expression der intakten ObR Isoform in JEG-3 Zellen nach Behandlung mit 10 nmol/ml 9-*cis*RA für 4h signifikant zunimmt. Auf Proteinebene führte 9-*cis*RA nach 24h ebenfalls zu einer signifikanten Erhöhung der ObR Expression in JEG-3 Zellen. Leptin besitzt die Fähigkeit, Apoptose zu verhindern und die Überlebensfähigkeit von Trophoblasten zu fördern [131]. Die Zufuhr von exogenem Leptin kann einen durch Leptinmangel bedingten apoptotischen Zustand in Trophoblasten sogar reversibel umkehren [131]. Eine Erhöhung der ObR Expression kann vermutlich als eine Reaktion von ObR auf ein vermindertes Leptin Angebot während des Abortgeschehens verstanden werden. Leptin agiert gegen die durch Retinsäure-bedingte Apoptose in Trophoblasten. Das pro-apoptotische Retinoid 9-*cis*RA verursacht somit eine vermehrte Expression des Rezeptors ObR in Trophoblasten, damit dieser mehr Leptin bindet und dem hypoleptinämischen Zustand entgegenwirkt. Dadurch kann Leptin die Apoptose verhindern, was bereits von Gordeladze *et al.* im Jahr 2002 vorgeschlagen wurde [218]. Sie demonstrierten, dass eine Zugabe von Leptin vor ATRA-induzierter Apoptose in humanen Osteoblasten schützt [218]. Die erhöhte Expression von ObR verbessert wahrscheinlich das Ansprechen der Trophoblasten auf Leptin in einem Zustand in dem ein Leptinmangel existiert [219]. Perez-Perez *et al.* (2008) stellten die These auf, dass die Plazenta eine Überproduktion von Leptin bei hypoxischen Zuständen wie Gestationsdiabetes und Präeklampsie einleitet, um eine stress-induzierte Apoptose in Trophoblasten zu verhindern [170]. In ihrer Studie untersuchten Perez-Perez *et al.* (2008) die Signaltransduktion von Leptin in der Plazenta und fanden heraus, dass Leptin die Apoptose von Trophoblasten über den MAPK Signalweg hemmt. Während der Schwangerschaft nimmt Leptin die Rolle eines fetalen Wachstumsfaktors ein [163].

Obwohl BeWo und JEG-3 Zellen beides Trophoblasttumorzellen sind, konnten in den zwei Zelllinien unterschiedliche Effekte von 9-*cis*RA auf die ObR Protein- und mRNA



Expression nachgewiesen werden. Im Dot Blot und in der quantitativen TaqMan®-PCR induzierte die Retinsäure eine signifikante Erhöhung der ObR Expression in JEG-3 Zellen, wohingegen sich die Zunahme der ObR Expression in BeWo Zellen als nicht signifikant erwies. Ein Grund für die unterschiedliche ObR Expression kann die Synzytiumbildung sein, hinsichtlich der sich die beiden Zelllinien voneinander unterscheiden [220]. BeWo Zellen sind fusionsfähig [183] und besitzen Zytotrophoblasten- und Synzytiotrophoblasten-ähnliche Phänotypen [185]. Aufgrund ihrer Eigenschaften entsprechen BeWo Zellen daher eher villösen Trophoblasten (VT). Im Gegensatz dazu, ist für JEG-3 Zellen ein invasives Wachstum typisch. Die Ergebnisse des Einflusses von 9-*cis*RA auf die ObR Expression in BeWo und JEG-3 Zellen stimmt mit unseren vorherigen Erkenntnissen überein [174]: In VT von Aborten konnten wir eine erhöhte Expression von ObR feststellen, die jedoch nicht signifikant ausfiel. Hingegen haben wir in EVT von Aborten im Vergleich zu EVT gesunder Schwangerschaften eine signifikante Erhöhung von ObR detektiert [174]. Eine andere Zeitkinetik auf mRNA- und Proteinebene der BeWo Zellen im Vergleich zu JEG-3 Zellen könnte ein weiterer Grund für die voneinander abweichenden Resultate hinsichtlich der ObR Expression nach Retinsäure-Stimulation in den beiden Zelllinien sein.

Eine essentielle Frage bzgl. der Involvierung von ObR in den molekularen Mechanismen von Aborten befasst sich mit der chronologischen Reihenfolge der verschiedenen Ereignisse der ObR Signaltransduktion und lautet: Besteht initial eine erhöhte ObR Expression, die dann zum Abort führt, oder tritt die vermehrte ObR Expression erst auf, nachdem der Abort „induziert“ ist? Eine mögliche Hypothese ist, dass ObR im Abort, wo vermehrt Apoptose auftritt, diesem Zustand entgegensteuert, indem es seine vermehrte Expression in Trophoblasten veranlasst. Dadurch reagieren die Trophoblasten sensibler auf Leptin, welches in vermehrter Menge an die Rezeptoren bindet und dadurch eine anti-apoptotische Wirkung besitzt. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit letzterer Vermutung, nach welcher die Zunahme der ObR Expression als Reaktion auf den Abort bedingt ist. Aktuell fehlen jedoch fundierte Aussagen über die Reihenfolge der plazentaren Veränderungen im Abort. Die Fragestellung über die Signaltransduktionen im Abort ist Gegenstand aktueller Forschung.

In ihrer Studie über den Einfluss von Retinoiden auf die Leptin Synthese und Sekretion in humanen Synzytiotrophoblasten konnten Guibourdenche *et al.* (2000) zeigen, dass eine Inkubation von humanen Trophoblasten mit 0,1  $\mu\text{mol/l}$  9-*cis*RA für 72h und 96h zu einer Erhöhung der Leptin mRNA Expression führt [34]. Zusätzlich konnten sie eine signifikant erhöhte Leptinsekretion nach Stimulation mit 0,1  $\mu\text{mol/l}$  9-*cis*RA in humanen Trophoblasten erkennen. Diese Ergebnisse bekräftigen die vorliegende Vermutung, dass die pro-apoptotischen Retinsäuren zu einer Zunahme der ObR Expression und

indirekt zu einer vermehrten Leptin Expression führen, welches das Überleben der Trophoblasten fördert. Guibourdenche *et al.* (2000) betonten, dass die Expression und Sekretion von Leptin während der plazentaren Entwicklung ansteigen [34].

Im Gegensatz zu der Untersuchung von Guibourdenche *et al.* (2000), hat die Arbeitsgruppe Hollung *et al.* (2004) entdeckt, dass 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  ATRA nach 24h zu einer signifikanten Reduktion der Leptin mRNA Expression in humanem Fettgewebe führen [211]. Als Grund für das gegensätzlich ausfallende Expressionsverhalten in Fettgewebe, im Vergleich zu dem von Guibourdenche und Kollegen analysierten Expressionsverhalten der Leptin mRNA in Trophoblasten, vermuten sie eine gewebsspezifische Regulation von ATRA und Leptin. Wie bereits erwähnt, kann der Einfluss von Retinoiden in unterschiedlichen Geweben, abhängig von der Funktion des Gewebes, variieren. Die Synthese und Produktion von Leptin unterscheiden sich in der Plazenta im Vergleich zu anderen Gewebearten, um einen Schutz des Fetus vor zu starken Schwankungen des Leptinspiegels zu gewährleisten [211].

Als wichtige Erkenntnis der vorliegenden Untersuchungen gilt die Feststellung, dass die Retinsäure 9-*cis*RA mit dem Leptin-Signaltransduktionsweg interagiert. Gegenstand weiterer Forschung wird es sein, festzustellen über welchen Mechanismus sich Retinoide und Leptin bzw. sich Retinoide und ObR gegenseitig beeinflussen. In der Untersuchung der Promoter Region des Leptin Gens wurden keine Bindungsstellen für RXR gefunden [221-223]. Dies bedeutet, dass die Leptin Expression nicht durch eine klassische Interaktion von RXR und Leptin in Form von Heterodimeren oder Homodimeren mit einem Response Element reguliert wird [34]. Daraus lässt sich ableiten, dass auch ObR über einen bisher noch nicht definierten Mechanismus mit Retinsäurederivaten interagiert. Die Produktion und Sekretion von Leptin wird durch Substanzen, die die Proteinkinase C (PKC) und cyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) aktivieren können, beeinflusst [224, 225]. Die Retinoide 9-*cis*RA und ATRA können mit Leptin durch Stimulation von cAMP und PKC interagieren [226]. Aus diesem Grund stellen cAMP und PKC mögliche Signalwege dar, über die Retinoide und Leptin miteinander in Wechselwirkung treten.

In einer vorausgegangenen Studie der Arbeitsgruppe von Toth und Jeschke *et al.* (2008) wurde die Expression von RXR $\alpha$ , PPAR $\gamma$  und PPAR $\beta/\delta$  in Trophoblasten untersucht [125]. Es stellte sich heraus, dass in EVT von Aborten die Expression von RXR $\alpha$ , PPAR $\gamma$  und PPAR $\beta/\delta$  signifikant erhöht ist [125]. Für die vorliegenden Versuche wurden daher Liganden von RXR, RAR und PPAR bzw. 9-*cis*RA, ATRA und 15d-J<sub>2</sub> als Stimulationssubstanzen verwendet und nicht ausschließlich RXR $\alpha$  Liganden herangezogen. Dadurch wurden zusätzliche Signaltransduktionswege in die Untersuchung mit eingeschlossen.

Obwohl die Immunzytochemie und der Dotblot beides Methoden sind, die Aussagen über die Proteinexpression liefern, fielen die Ergebnisse der ObR Expression unter Einfluss von 9-*cis*RA in beiden Methoden unterschiedlich aus. In der Immunzytochemie konnten keine definitiven Aussagen zur ObR Expression nach Inkubation mit der Retinsäure getroffen werden. In Gegenüberstellung konnte bedingt durch 9-*cis*RA im Dotblot eine vermehrte ObR Expression angezeigt werden. Im Gegensatz zu kernständigen Färbungen, wie der immunzytochemischen Analyse von RXR $\alpha$ , die eine gleichmäßige Intensität der Kernfärbung erzeugt, erweist sich die Anfärbung von membranständigen Rezeptoren wie ObR als uneinheitlich. Im Vergleich zu Paraffinschnitten beispielsweise, wölben sich in der Immunzytochemie die Zellen, die einen Monolayer bilden, in einer rhomboiden Struktur über die Oberfläche. Dadurch wird nicht die gesamte Zelle bedingt durch die Schnittfläche bei der Färbung erfasst. Die Quantifizierung der immunzytochemischen Anfärbung der mit Anti-ObR behandelten Zellen ist daher erschwert und eine Analyse der ObR Expression mittels Immunzytochemie nicht aussagekräftig. Wenn das Zelllysate, wie im Falle des Dot Blots, auf eine glatte Fläche appliziert wird, resultiert die Darstellung der Zellen aus einem initialen 3-dimensionalen- in einem 2-dimensionalen Format. Zu Beginn der Durchführung des Dot Blots wird die Zellmembran der BeWo und JEG-3 Zellen isoliert. Der Punkt im Dot Blot ist eine eindeutig festgelegte und einheitlich aufgetragene Fläche. Die automatisierte technische Auswertung des Dot Blots mittels eines objektiven Grafikprogramms führt weg von der subjektiven Einschätzung des Betrachters und liefert objektive quantitative Auswertungen.

Zusammenfassend zeigt sich eine Abnahme der RXR $\alpha$  Expression in HVT und in Chorionkarzinomzellen, induziert durch Retinsäuren und den PPAR $\gamma$  Agonist 15d-J<sub>2</sub>. Die Expressionsabnahme erwies sich als abhängig von der Dosis und der Inkubationszeit der Substanzen. Untersuchungen legen eine klare Assoziation zwischen RXR $\alpha$  und Apoptose, sowie Frühaborten nahe. RXR $\alpha$  spielt möglicherweise eine entscheidende Rolle in der Induktion von Apoptose. Die Reduktion der RXR $\alpha$  Expression kann als möglicher Schutz vor Apoptose in Trophoblasten bzw. als Aborte vermeidender Faktor gedeutet werden [197]. Zusätzlich wurde eine durch 9-*cis*RA induzierte Zunahme der ObR Expression in JEG-3 Zellen festgestellt. Dieses fungiert aller Voraussicht nach als Kompensation der Trophoblasttumorzellen bei Leptin Mangelzuständen im apoptotischen Zustand. RXR $\alpha$  ist ein vielversprechender Rezeptor in zielgerichteten Therapiestrategien, da er als Transkriptionsfaktor zelluläre Prozesse auf Genexpressionsebene beeinflusst [42, 54]. Insbesondere RXR $\alpha$  repräsentiert einen „potentiellen therapeutischen Kandidaten“ [24] als Zielrezeptor in der Prävention von rezidivierenden Aborten.

## 6 Zusammenfassung

Etwa 25-50% der Frauen im reproduktionsfähigen Alter erleiden in ihrem Leben einen spontanen Abort und 2-3% der Frauen rezidivierende Aborte [1]. Ein Großteil der Aborte bleiben weiterhin ungeklärt [4]. Folglich besteht ein essentieller Forschungsbedarf in der Ursachenerkundung und Prävention von Aborten.

Die Rezeptoren Retinoid-X-Rezeptor  $\alpha$  (RXR $\alpha$ ) und Leptin Rezeptor (ObR) spielen eine Rolle in der plazentaren und fetalen Entwicklung. In vorherigen Studien konnte die Arbeitsgruppe von Toth und Jeschke *et al.* (2008 und 2009) zeigen, dass die Expression von RXR $\alpha$  und ObR jeweils in villösen- (VT) und extravillösen Trophoblasten (EVT) erhöht ist. In einer weiteren Studie konnte eine vermehrte Anzahl an apoptotischen EVT in Aborten festgestellt werden [191].

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Analyse der (patho-) physiologischen Rolle der Rezeptoren RXR $\alpha$  und ObR in Aborten mit speziellem Fokus auf apoptotische Prozesse. Dazu dienten Stimulationsversuche, in denen humane villöse Trophoblasten und Trophoblast-Modellzellen mit Retinsäuren und einem Prostaglandin-Derivat inkubiert wurden und deren Einfluss auf die RXR $\alpha$  und ObR Expression in den Zelllinien untersucht wurde. Des Weiteren wurde die Expression der Rezeptoren zusammen mit einem Marker für Apoptose in Abortplazenten detektiert.

Es konnte gezeigt werden, dass die Substanzen zu einer Abnahme der RXR $\alpha$  Expression in Trophoblast- und Trophoblastmodellzellen führen. Da Abortplazenten eine erhöhte RXR $\alpha$  Expression aufweisen und mit einer vermehrten Anzahl an apoptotischen EVT assoziiert werden, dient die Liganden-abhängige Reduktion der RXR $\alpha$  Expression durch die Substanzen vermutlich als Schutz vor einem apoptotischen Zustand bzw. vor einem Abort. RXR $\alpha$  stellt einen potentiellen Zielrezeptor in der Prävention von Aborten dar. Die ObR Expression in Trophoblastmodellzellen wurde durch die Retinsäure erhöht. Die Zunahme der ObR Expression kann als eine potentielle Reaktion auf ein vermindertes Leptin Angebot im Abort gedeutet werden. Weiterhin konnte eine Co-Expression des Apoptosemarkers mit RXR $\alpha$  bzw. ObR in EVT von Abortplazenten beobachtet werden.

Als Ergebnis sind die vorliegenden Erkenntnisse nicht nur für das Verständnis über die Regulation der Rezeptoren im Abortprozess, sondern auch für den physiologischen Schwangerschaftsverlauf von zentraler Bedeutung.

## 7 Abkürzungen und Symbole

<	kleiner
>	größer
$\Delta$ CT	Cycle Treshhold Wert
°C	Grad Celcius
‰	Promille
15d-J <sub>2</sub>	15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J <sub>2</sub>
9- <i>cis</i> RA	9- <i>cis</i> -Retinsäure
A	Österreich
ABC-Methode	Avidin-Biotin-Komplex Methode
AEC plus	3-Amino-9-ethylcarbazol
Anti-RXR $\alpha$	monoklonaler RXR $\alpha$ Antikörper
Anti-p-RXR $\alpha$	polyklonaler RXR $\alpha$ Antikörper
Anti-ObR	monoklonaler Leptin Rezeptor Antikörper
Anti-p-ObR	polyklonaler Leptin Rezeptor Antikörper
AR	Androgen Rezeptor
ATRA	All- <i>trans</i> -Retinsäure
Aqua dest.	Aqua destillata, destilliertes Wasser
$\beta$ ACT	Beta-Actin
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphate p-Toluidine Salz
BeWo	Chorionkarzinomzelllinie
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
CAR	Constitutiver Androstane Rezeptor
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
CK-7	Cytokeratin-7
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CRBP	Zelluläre-Retinol-Bindende Proteine
CRH	Corticotropin-Releasing-Hormon
Cy-2	Carbocyanin-Antikörper
Cy-3	Indocarbocyanin-Antikörper
DAPI	4'6-diamino-2-phenylindole
DBD	DNA-Bindungs-Domäne
DE	Deutschland
DHA	Docosahexanoic acid
DK	Dänemark
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Nährmedium

DMSO	Dimethyl Sulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	England
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
engl.	Englisch
ER	Östrogen Rezeptor
EVT	extravillöser Trophoblast
FasL	Fas Ligand
FCS	Fetales Kalbserum
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
FTZ-F1	FTZ Transcription Factor 1
FXR	Farnesoid-X-Rezeptor
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCNF	Germ Cell Nuclear Factor
ggt.	Guttae = Tropfen
Gimp®	GNU Image Program
GR	Glukokortikoidrezeptor
GTN	Gestational Trophoblastic Neoplasias
h	Stunde
hCG	humanes Choriogonadotropin
HNF-4	Hepatozyten Nukleärer Faktor 4
HPL	Humanes Plazentalaktogen
HVT	humane villöse Trophoblasten
I	Italien
Ig	Immunglobulin
IUGR	intrauterine Retardierung
JAK	Janus Kinase
JP	Japan
JEG-3	Chorionkarzinomzelllinie
kDa	kilo Dalton, atomare Masseneinheit
LBD	Liganden-Bindungs Domäne
LEPR	Leptin Rezeptor
LPA	Lysophosphatid Säure
LXR	Leber-X-Rezeptor
M30	M30 CytoDEATH™
MAPK	Ras-Mitogen activated protein kinase
MCF-7	Mammakarzinom-Zelllinie

MDB	Membran Desalting Buffer
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MMP	Matrix Metalloproteinase
MR	Mineralkortikoid Rezeptor
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
mSV	Millisievert
Na-Azid	Natrium-Azid
NBT	Nitro-Blue Tetrazolium Chlorid
NGFI-B	Nerve Growth Factor IB
nmol	Nanomol
Nor-1	Neuronen-abgeleiteter Orphan Rezeptor 1
Nurr-1	Nuclear-Receptor Related-1
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
ObR	Leptin Rezeptor
oxLDL	oxidiertes Low Density Lipoprotein
p.c.	post conceptionem
p.m.	post menstruationem
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCOS	Polyzystisches Ovar Syndrom
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	pondus Hydrogenii
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPAR	Peroxisomen-Proliferator-aktivierter-Rezeptor
PR	Progesteron Rezeptor
p-Wert	probability value, Signifikanzwert
PXR	Pregnane-X-Rezeptor
RAE	Retinsäureembryopathie
RAR	Retinsäure-A-Rezeptor
ROR	RAR-verwandte Waisen Rezeptor
RT-PCR	Quantitative Real-time PCR
RXRE	Retinoid-X-Response Element
RXR $\alpha$	Retinoid-X-Rezeptor alpha
sec	Sekunde
SF-1	Steroidogenic Factor-1

SPSS	Social Sciences Computer Software Version
SSW	Schwangerschaftswoche
STAT	signal transducer and activator of transcription
Taq	DNA-Polymerase des <i>Thermus aquaticus</i> (Bakterium)
TBS	Tris-buffered Saline
TR	Thyroidhormonrezeptor
TTNPB	4-[(E)-2-(5,6,7,8-Tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthalenyl)-1-propenyl] benzoic acid
Ucn	Urocortin
Upm	Umdrehungen pro Minute
VAD-Syndrom	Vitamin A Defizienz-Syndrom
VDR	Vitamin-D-Rezeptor
VT	villöser Trophoblast
W	Watt
WHO	World Health Organization
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter



## 8 Literaturverzeichnis

1. Rai, R. and L. Regan, *Recurrent miscarriage*. Lancet, 2006. **368**(9535): p. 601-11.
2. Haag, P., N. Hanhart, and M. Müller, *Gynäkologie und Urologie : für Studium und Praxis 2010/11 ; inkl.Geburtshilfe, Reproduktionsmedizin, Sexualmedizin, Andrologie u. Venerologie; unter Berücks. d. GK u. d.mündl. Examina in d. Ärztl. Prüfungen*. 5. Aufl. ed. 2009, Breisach am Rhein: Mediz. Verl.- u. Inform.-Dienste. XI, 450 S.
3. Kiechle, M., *Gynäkologie und Geburtshilfe : mit 237 Tabellen ; [mit dem Plus im Web ; Zugangscode im Buch]*. 2., überarb. Aufl. ed. 2011, München: Elsevier, Urban & Fischer. XII, 577 S.
4. Regan, L. and R. Rai, *Epidemiology and the medical causes of miscarriage*. Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2000. **14**(5): p. 839-54.
5. (DGGG), A.I.i.G.u.G.A.u.D.G.f.G.u.G., *Diagnostik und Therapie beim wiederholten Spontanabort*. AWMF Leitlinienregister, 2010. **015/050**.
6. Gold, K.J., A. Sen, and R.A. Hayward, *Marriage and cohabitation outcomes after pregnancy loss*. Pediatrics, 2010. **125**(5): p. e1202-7.
7. Anbalagan, M., et al., *Post-translational modifications of nuclear receptors and human disease*. Nucl Recept Signal, 2012. **10**: p. e001.
8. Kostrouch, Z., et al., *Retinoic acid X receptor in the diploblast, Tripedalia cystophora*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(23): p. 13442-7.
9. Escriva, H., et al., *Ligand binding was acquired during evolution of nuclear receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(13): p. 6803-8.
10. Ahuja, H.S., et al., *The retinoid X receptor and its ligands: versatile regulators of metabolic function, cell differentiation and cell death*. J Biol Regul Homeost Agents, 2003. **17**(1): p. 29-45.
11. Christiansen, K. *Internetauftritt der Albert Lasker Preis Foundation [www.laskerfoundation.org](http://www.laskerfoundation.org)*, 2004.
12. Mangelsdorf, D.J., et al., *A direct repeat in the cellular retinol-binding protein type II gene confers differential regulation by RXR and RAR*. Cell, 1991. **66**(3): p. 555-61.
13. Strauss, E. *Internetauftritt der Albert Lasker Preis Foundation [www.laskerfoundation.org](http://www.laskerfoundation.org)*, 2004.
14. Mader, S., et al., *The patterns of binding of RAR, RXR and TR homo- and heterodimers to direct repeats are dictated by the binding specificities of the DNA binding domains*. EMBO J, 1993. **12**(13): p. 5029-41.
15. Nagpal, S., et al., *RARs and RXRs: evidence for two autonomous transactivation functions (AF-1 and AF-2) and heterodimerization in vivo*. EMBO J, 1993. **12**(6): p. 2349-60.
16. Mangelsdorf, D.J. and R.M. Evans, *The RXR heterodimers and orphan receptors*. Cell, 1995. **83**(6): p. 841-50.
17. Zhang, X.K. and M. Pfahl, *Hetero- and homodimeric receptors in thyroid hormone and vitamin A action*. Receptor, 1993. **3**(3): p. 183-91.
18. A, I.J., et al., *In vivo activation of PPAR target genes by RXR homodimers*. EMBO J, 2004. **23**(10): p. 2083-91.
19. McEwan, I.J., *Nuclear receptors: one big family*. Methods Mol Biol, 2009. **505**: p. 3-18.
20. Giguere, V., *Orphan nuclear receptors: from gene to function*. Endocr Rev, 1999. **20**(5): p. 689-725.
21. Dawson, M.I. and X.K. Zhang, *Discovery and design of retinoic acid receptor and retinoid X receptor class- and subtype-selective synthetic analogs of all-trans-retinoic acid and 9-cis-retinoic acid*. Curr Med Chem, 2002. **9**(6): p. 623-37.
22. Mangelsdorf, D.J., *Vitamin A receptors*. Nutr Rev, 1994. **52**(2 Pt 2): p. S32-44.

23. Ross, S.A., et al., *Retinoids in embryonal development*. Physiol Rev, 2000. **80**(3): p. 1021-54.
24. Desvergne, B., *RXR: from partnership to leadership in metabolic regulations*. Vitam Horm, 2007. **75**: p. 1-32.
25. Allenby, G., et al., *Retinoic acid receptors and retinoid X receptors: interactions with endogenous retinoic acids*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(1): p. 30-4.
26. Mangelsdorf, D.J., et al., *Retinoid receptors*. Recent Prog Horm Res, 1993. **48**: p. 99-121.
27. Safer, J.D., et al., *Defective release of corepressor by hinge mutants of the thyroid hormone receptor found in patients with resistance to thyroid hormone*. J Biol Chem, 1998. **273**(46): p. 30175-82.
28. Aranda, A. and A. Pascual, *Nuclear hormone receptors and gene expression*. Physiol Rev, 2001. **81**(3): p. 1269-304.
29. Duttaroy, A.K., *Fetal growth and development: roles of fatty acid transport proteins and nuclear transcription factors in human placenta*. Indian J Exp Biol, 2004. **42**(8): p. 747-57.
30. Kodera, Y., et al., *Ligand type-specific interactions of peroxisome proliferator-activated receptor gamma with transcriptional coactivators*. J Biol Chem, 2000. **275**(43): p. 33201-4.
31. Nolte, R.T., et al., *Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma*. Nature, 1998. **395**(6698): p. 137-43.
32. Xu, L., C.K. Glass, and M.G. Rosenfeld, *Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function*. Curr Opin Genet Dev, 1999. **9**(2): p. 140-7.
33. Singh, R.R., et al., *9-cis-retinoic acid up-regulates expression of transcriptional coregulator PELP1, a novel coactivator of the retinoid X receptor alpha pathway*. J Biol Chem, 2006. **281**(22): p. 15394-404.
34. Guibourdenche, J., et al., *Retinoids stimulate leptin synthesis and secretion in human syncytiotrophoblast*. J Clin Endocrinol Metab, 2000. **85**(7): p. 2550-5.
35. Cao, X., et al., *Retinoid X receptor regulates Nur77/TR3-dependent apoptosis [corrected] by modulating its nuclear export and mitochondrial targeting*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(22): p. 9705-25.
36. DeLuca, H.F., *Overview of general physiologic features and functions of vitamin D*. Am J Clin Nutr, 2004. **80**(6 Suppl): p. 1689S-96S.
37. Kovacs, C.S. and H.M. Kronenberg, *Maternal-fetal calcium and bone metabolism during pregnancy, puerperium, and lactation*. Endocr Rev, 1997. **18**(6): p. 832-72.
38. Barrera, D., et al., *Estradiol and progesterone synthesis in human placenta is stimulated by calcitriol*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2007. **103**(3-5): p. 529-32.
39. Evans, K.N., et al., *Vitamin D and placental-decidual function*. J Soc Gynecol Investig, 2004. **11**(5): p. 263-71.
40. Halhali, A., G.M. Acker, and M. Garabedian, *1,25-Dihydroxyvitamin D3 induces in vivo the decidualization of rat endometrial cells*. J Reprod Fertil, 1991. **91**(1): p. 59-64.
41. Stephanou, A., R. Ross, and S. Handwerger, *Regulation of human placental lactogen expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3*. Endocrinology, 1994. **135**(6): p. 2651-6.
42. Arck, P., et al., *Nuclear receptors of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) family in gestational diabetes: from animal models to clinical trials*. Biol Reprod, 2010. **83**(2): p. 168-76.
43. Toth, B., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptors: new players in the field of reproduction*. Am J Reprod Immunol, 2007. **58**(3): p. 289-310.
44. Barak, Y., et al., *Effects of peroxisome proliferator-activated receptor delta on placentation, adiposity, and colorectal cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(1): p. 303-8.
45. Barak, Y., et al., *PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development*. Mol Cell, 1999. **4**(4): p. 585-95.
46. Kubota, N., et al., *PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance*. Mol Cell, 1999. **4**(4): p. 597-609.

47. Nadra, K., et al., *Differentiation of trophoblast giant cells and their metabolic functions are dependent on peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(8): p. 3266-81.
48. Peters, J.M., et al., *Growth, adipose, brain, and skin alterations resulting from targeted disruption of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor beta(delta)*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(14): p. 5119-28.
49. Desvergne, B. and W. Wahli, *Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism*. Endocr Rev, 1999. **20**(5): p. 649-88.
50. McIntyre, T.M., et al., *Identification of an intracellular receptor for lysophosphatidic acid (LPA): LPA is a transcellular PPARgamma agonist*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(1): p. 131-6.
51. Schopfer, F.J., et al., *Nitrolinoleic acid: an endogenous peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(7): p. 2340-5.
52. Giaginis, C., E. Spanopoulou, and S. Theocharis, *PPAR-gamma signaling pathway in placental development and function: a potential therapeutic target in the treatment of gestational diseases*. Expert Opin Ther Targets, 2008. **12**(8): p. 1049-63.
53. Kastner, P., M. Mark, and P. Chambon, *Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life?* Cell, 1995. **83**(6): p. 859-69.
54. Pestka, A., et al., *Nuclear Hormone Receptors and Female Reproduction*. Curr Mol Med, 2012.
55. Mangelsdorf, D.J., et al., *Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid*. Genes Dev, 1992. **6**(3): p. 329-44.
56. Georgiades, P. and P.M. Brickell, *Regulation of retinoid X receptor-gamma gene transcript levels in rat heart cells*. Cell Biol Int, 1998. **22**(6): p. 457-63.
57. McDermott, N.B., et al., *Isolation and functional analysis of the mouse RXRgamma1 gene promoter in anterior pituitary cells*. J Biol Chem, 2002. **277**(39): p. 36839-44.
58. Schuler, M.J. and D. Pette, *Quantification of thyroid hormone receptor isoforms, 9-cis retinoic acid receptor gamma, and nuclear receptor co-repressor by reverse-transcriptase PCR in maturing and adult skeletal muscles of rat*. Eur J Biochem, 1998. **257**(3): p. 607-14.
59. Heyman, R.A., et al., *9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor*. Cell, 1992. **68**(2): p. 397-406.
60. Collins, M.D. and G.E. Mao, *Teratology of retinoids*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1999. **39**: p. 399-430.
61. Urquiza, M., et al., *Plasmodium falciparum AMA-1 erythrocyte binding peptides implicate AMA-1 as erythrocyte binding protein*. Vaccine, 2000. **19**(4-5): p. 508-13.
62. Szanto, A., et al., *Retinoid X receptors: X-ploring their (patho)physiological functions*. Cell Death Differ, 2004. **11 Suppl 2**: p. S126-43.
63. Um, S., et al., *Retinoic acid receptors interact physically and functionally with the T:G mismatch-specific thymine-DNA glycosylase*. J Biol Chem, 1998. **273**(33): p. 20728-36.
64. Chambon, P., *The retinoid signaling pathway: molecular and genetic analyses*. Semin Cell Biol, 1994. **5**(2): p. 115-25.
65. Krezel, W., et al., *RXR gamma null mice are apparently normal and compound RXR alpha +/-RXR beta -/-RXR gamma -/- mutant mice are viable*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(17): p. 9010-4.
66. Kastner, P., et al., *Genetic analysis of RXR alpha developmental function: convergence of RXR and RAR signaling pathways in heart and eye morphogenesis*. Cell, 1994. **78**(6): p. 987-1003.
67. Sucov, H.M., et al., *RXR alpha mutant mice establish a genetic basis for vitamin A signaling in heart morphogenesis*. Genes Dev, 1994. **8**(9): p. 1007-18.
68. Sapin, V., et al., *Defects of the chorioallantoic placenta in mouse RXRalpha null fetuses*. Dev Biol, 1997. **191**(1): p. 29-41.

69. Krezel, W., et al., *Impaired locomotion and dopamine signaling in retinoid receptor mutant mice*. Science, 1998. **279**(5352): p. 863-7.
70. Mark, M., N.B. Ghyselinck, and P. Chambon, *Function of retinoic acid receptors during embryonic development*. Nucl Recept Signal, 2009. **7**: p. e002.
71. Tarrade, A., et al., *PPARgamma/RXRalpha heterodimers control human trophoblast invasion*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(10): p. 5017-24.
72. Duttaroy, A.K., *Transport of fatty acids across the human placenta: a review*. Prog Lipid Res, 2009. **48**(1): p. 52-61.
73. Holdsworth-Carson, S.J., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptors are altered in pathologies of the human placenta: gestational diabetes mellitus, intrauterine growth restriction and preeclampsia*. Placenta, 2010. **31**(3): p. 222-9.
74. Grune, T., et al., *Beta-carotene is an important vitamin A source for humans*. J Nutr, 2010. **140**(12): p. 2268S-2285S.
75. Blomhoff, R., et al., *Transport and storage of vitamin A*. Science, 1990. **250**(4979): p. 399-404.
76. Niederreither, K. and P. Dolle, *Retinoic acid in development: towards an integrated view*. Nat Rev Genet, 2008. **9**(7): p. 541-53.
77. Rassow, J., *Biochemie : 50 Tabellen*. 2006, Stuttgart: Thieme. XXX, 836 S.
78. Lee, G.S., D.M. Kochhar, and M.D. Collins, *Retinoid-induced limb malformations*. Curr Pharm Des, 2004. **10**(22): p. 2657-99.
79. Tarrade, A., et al., *PPAR gamma/RXR alpha heterodimers are involved in human CG beta synthesis and human trophoblast differentiation*. Endocrinology, 2001. **142**(10): p. 4504-14.
80. Cho, S., et al., *9-cis-Retinoic acid represses transcription of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene via proximal promoter region that is distinct from all-trans-retinoic acid response element*. Brain Res Mol Brain Res, 2001. **87**(2): p. 214-22.
81. Gudas, L.J., *Retinoids and vertebrate development*. J Biol Chem, 1994. **269**(22): p. 15399-402.
82. Nagy, L., et al., *Retinoid-induced apoptosis in normal and neoplastic tissues*. Cell Death Differ, 1998. **5**(1): p. 11-9.
83. Altucci, L. and H. Gronemeyer, *Decryption of the retinoid death code in leukemia*. J Clin Immunol, 2002. **22**(3): p. 117-23.
84. Takahashi, Y.I., et al., *Vitam A deficiency and fetal growth and development in the rat*. J Nutr, 1975. **105**(10): p. 1299-310.
85. Wilson, J.G. and S. Barch, *Fetal death and maldevelopment resulting from maternal vitamin A deficiency in the rat*. Proc Soc Exp Biol Med, 1949. **72**(3): p. 687-93, illust.
86. Wilson, J.G., C.B. Roth, and J. Warkany, *An analysis of the syndrome of malformations induced by maternal vitamin A deficiency. Effects of restoration of vitamin A at various times during gestation*. Am J Anat, 1953. **92**(2): p. 189-217.
87. Wilson, J.G. and J. Warkany, *Malformations in the genito-urinary tract induced by maternal vitamin A deficiency in the rat*. Am J Anat, 1948. **83**(3): p. 357-407.
88. Wilson, J.G. and J. Warkany, *Aortic-arch and cardiac anomalies in the offspring of vitamin A deficient rats*. Am J Anat, 1949. **85**(1): p. 113-55.
89. Mayo-Wilson, E., et al., *Vitamin A supplements for preventing mortality, illness, and blindness in children aged under 5: systematic review and meta-analysis*. BMJ, 2011. **343**: p. d5094.
90. Grune, T., et al., *{beta}-Carotene Is an Important Vitamin A Source for Humans*. J Nutr, 2010. **140**(12): p. 2268S-85S.
91. Lammer, E.J., et al., *Retinoic acid embryopathy*. N Engl J Med, 1985. **313**(14): p. 837-41.
92. Macejova, D., O. Krizanová, and J. Brtko, *Different mRNA expression profiling of nuclear retinoid, thyroid, estrogen and PPARgamma receptors, their coregulators and selected genes in rat liver and spleen in response to short-term in vivo administration of 13-cis retinoic acid*. Toxicol Lett, 2009. **184**(2): p. 114-20.

93. Lucek, R.W. and W.A. Colburn, *Clinical pharmacokinetics of the retinoids*. Clin Pharmacokinet, 1985. **10**(1): p. 38-62.
94. Monga, M., *Vitamin A and its congeners*. Semin Perinatol, 1997. **21**(2): p. 135-42.
95. Oakley, G.P., Jr. and J.D. Erickson, *Vitamin A and birth defects. Continuing caution is needed*. N Engl J Med, 1995. **333**(21): p. 1414-5.
96. Mark, M., N.B. Ghyselinck, and P. Chambon, *Function of retinoid nuclear receptors: lessons from genetic and pharmacological dissections of the retinoic acid signaling pathway during mouse embryogenesis*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2006. **46**: p. 451-80.
97. Kochhar, D.M., et al., *Differential teratogenic response of mouse embryos to receptor selective analogs of retinoic acid*. Chem Biol Interact, 1996. **100**(1): p. 1-12.
98. Warrell, R.P., Jr., et al., *Differentiation therapy of acute promyelocytic leukemia with tretinoin (all-trans-retinoic acid)*. N Engl J Med, 1991. **324**(20): p. 1385-93.
99. Altucci, L., et al., *Rexinoid-triggered differentiation and tumor-selective apoptosis of acute myeloid leukemia by protein kinase A-mediated desubordination of retinoid X receptor*. Cancer Res, 2005. **65**(19): p. 8754-65.
100. Fisher, G.J., et al., *Cellular, immunologic and biochemical characterization of topical retinoic acid-treated human skin*. J Invest Dermatol, 1991. **96**(5): p. 699-707.
101. Ghasri, P., et al., *Acitretin for the treatment of psoriasis: an assessment of national trends*. J Drugs Dermatol, 2011. **10**(8): p. 873-7.
102. Lee, H.P., et al., *All-trans retinoic acid as a novel therapeutic strategy for Alzheimer's disease*. Expert Rev Neurother, 2009. **9**(11): p. 1615-21.
103. Shudo, K., et al., *Towards retinoid therapy for Alzheimer's disease*. Curr Alzheimer Res, 2009. **6**(3): p. 302-11.
104. Gerber, L.E. and J.W. Erdman, Jr., *Changes in lipid metabolism during retinoid administration*. J Am Acad Dermatol, 1982. **6**(4 Pt 2 Suppl): p. 664-74.
105. Egger, S.F., et al., *Ocular side effects associated with 13-cis-retinoic acid therapy for acne vulgaris: clinical features, alterations of tearfilm and conjunctival flora*. Acta Ophthalmol Scand, 1995. **73**(4): p. 355-7.
106. Smith, W., *Eicosanoid nomenclature*. Prostaglandins, 1989. **38**(1): p. 125-33.
107. Harris, S.G., et al., *Prostaglandins as modulators of immunity*. Trends Immunol, 2002. **23**(3): p. 144-50.
108. Fukushima, M., *Prostaglandin J2--anti-tumour and anti-viral activities and the mechanisms involved*. Eicosanoids, 1990. **3**(4): p. 189-99.
109. Fukushima, M., *Biological activities and mechanisms of action of PGJ2 and related compounds: an update*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 1992. **47**(1): p. 1-12.
110. Kliewer, S.A., et al., *A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation*. Cell, 1995. **83**(5): p. 813-9.
111. Forman, B.M., et al., *15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma*. Cell, 1995. **83**(5): p. 803-12.
112. Krey, G., et al., *Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay*. Mol Endocrinol, 1997. **11**(6): p. 779-91.
113. Schaiff, W.T., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma modulates differentiation of human trophoblast in a ligand-specific manner*. J Clin Endocrinol Metab, 2000. **85**(10): p. 3874-81.
114. Keelan, J.A., et al., *15-Deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2), a ligand for peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, induces apoptosis in JEG3 choriocarcinoma cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **262**(3): p. 579-85.
115. Chinetti, G., et al., *Activation of proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages*. J Biol Chem, 1998. **273**(40): p. 25573-80.

116. Hortelano, S., et al., *Contribution of cyclopentenone prostaglandins to the resolution of inflammation through the potentiation of apoptosis in activated macrophages*. J Immunol, 2000. **165**(11): p. 6525-31.
117. Castrillo, A., et al., *Potentiation of protein kinase C zeta activity by 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J(2) induces an imbalance between mitogen-activated protein kinases and NF-kappa B that promotes apoptosis in macrophages*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(4): p. 1196-208.
118. Bishop-Bailey, D. and T. Hla, *Endothelial cell apoptosis induced by the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) ligand 15-deoxy-Delta12, 14-prostaglandin J2*. J Biol Chem, 1999. **274**(24): p. 17042-8.
119. Lappas, M., M. Permezel, and G.E. Rice, *15-Deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) and troglitazone regulation of the release of phospholipid metabolites, inflammatory cytokines and proteases from human gestational tissues*. Placenta, 2006. **27**(11-12): p. 1060-72.
120. Jawerbaum, A., et al., *Influence of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation by its endogenous ligand 15-deoxy Delta12,14 prostaglandin J2 on nitric oxide production in term placental tissues from diabetic women*. Mol Hum Reprod, 2004. **10**(9): p. 671-6.
121. Lord, J.M., I.H. Flight, and R.J. Norman, *Insulin-sensitising drugs (metformin, troglitazone, rosiglitazone, pioglitazone, D-chiro-inositol) for polycystic ovary syndrome*. Cochrane Database Syst Rev, 2003(3): p. CD003053.
122. Hollenberg, A.N., et al., *Functional antagonism between CCAAT/Enhancer binding protein-alpha and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma on the leptin promoter*. J Biol Chem, 1997. **272**(8): p. 5283-90.
123. Hong, S.E., et al., *Effect of retinoic acid on leptin, glycerol, and glucose levels in mature rat adipocytes in vitro*. J Med Food, 2004. **7**(3): p. 320-6.
124. Lee, J.I., et al., *A peroxisome-proliferator activated receptor-gamma ligand could regulate the expression of leptin receptor on human hepatic stellate cells*. Histochem Cell Biol, 2007. **127**(5): p. 495-502.
125. Toth, B., et al., *Leptin and peroxisome proliferator-activated receptors: impact on normal and disturbed first trimester human pregnancy*. Histol Histopathol, 2008. **23**(12): p. 1465-75.
126. Guettier, J.M., et al., *Leptin therapy for partial lipodystrophy linked to a PPAR-gamma mutation*. Clin Endocrinol (Oxf), 2008. **68**(4): p. 547-54.
127. Tartaglia, L.A., et al., *Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R*. Cell, 1995. **83**(7): p. 1263-71.
128. Harvey, J. and M.L. Ashford, *Leptin in the CNS: much more than a satiety signal*. Neuropharmacology, 2003. **44**(7): p. 845-54.
129. Takaya, K., et al., *Molecular cloning of rat leptin receptor isoform complementary DNAs--identification of a missense mutation in Zucker fatty (fa/fa) rats*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **225**(1): p. 75-83.
130. Bodner, J., et al., *Leptin receptor in human term placenta: in situ hybridization and immunohistochemical localization*. Placenta, 1999. **20**(8): p. 677-82.
131. Magarinos, M.P., et al., *Leptin promotes cell proliferation and survival of trophoblastic cells*. Biol Reprod, 2007. **76**(2): p. 203-10.
132. Karlsson, C., et al., *Expression of functional leptin receptors in the human ovary*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(12): p. 4144-8.
133. Kitawaki, J., et al., *Expression of leptin receptor in human endometrium and fluctuation during the menstrual cycle*. J Clin Endocrinol Metab, 2000. **85**(5): p. 1946-50.
134. Toth, B., et al., *Systemic changes in haemostatic balance are not associated with increased levels of circulating microparticles in women with recurrent spontaneous abortion*. Am J Reprod Immunol, 2008. **59**(2): p. 159-66.
135. Yamashita, H., et al., *Leptin administration prevents spontaneous gestational diabetes in heterozygous Lepr(db/+) mice: effects on placental leptin and fetal growth*. Endocrinology, 2001. **142**(7): p. 2888-97.
136. Nakashima, K., M. Narazaki, and T. Taga, *Leptin receptor (OB-R) oligomerizes with itself but not with its closely related cytokine signal transducer gp130*. FEBS Lett, 1997. **403**(1): p. 79-82.

137. White, D.W., et al., *Leptin receptor (OB-R) signaling. Cytoplasmic domain mutational analysis and evidence for receptor homo-oligomerization*. J Biol Chem, 1997. **272**(7): p. 4065-71.
138. Couturier, C. and R. Jockers, *Activation of the leptin receptor by a ligand-induced conformational change of constitutive receptor dimers*. J Biol Chem, 2003. **278**(29): p. 26604-11.
139. Tartaglia, L.A., *The leptin receptor*. J Biol Chem, 1997. **272**(10): p. 6093-6.
140. Schwartz, M.W., et al., *Central nervous system control of food intake*. Nature, 2000. **404**(6778): p. 661-71.
141. Rassow, J., R. Deutzmann, and R.N.u. a, *Duale Reihe Biochemie [Elektronische Ressource]*. 1. Aufl. ed. 2006, [s.l.]: Georg Thieme Verlag. Online Ressource (29342 KB, 869 S.).
142. Matarese, G., *Leptin and the immune system: how nutritional status influences the immune response*. Eur Cytokine Netw, 2000. **11**(1): p. 7-14.
143. Houseknecht, K.L., et al., *The biology of leptin: a review*. J Anim Sci, 1998. **76**(5): p. 1405-20.
144. Bado, A., et al., *The stomach is a source of leptin*. Nature, 1998. **394**(6695): p. 790-3.
145. Friedman, J.M. and J.L. Halaas, *Leptin and the regulation of body weight in mammals*. Nature, 1998. **395**(6704): p. 763-70.
146. Masuzaki, H., et al., *Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans*. Nat Med, 1997. **3**(9): p. 1029-33.
147. Wiesner, G., et al., *Leptin is released from the human brain: influence of adiposity and gender*. J Clin Endocrinol Metab, 1999. **84**(7): p. 2270-4.
148. Bouloumie, A., et al., *Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis*. Circ Res, 1998. **83**(10): p. 1059-66.
149. Sierra-Honigmann, M.R., et al., *Biological action of leptin as an angiogenic factor*. Science, 1998. **281**(5383): p. 1683-6.
150. Farooqi, I.S. and S. O'Rahilly, *Leptin: a pivotal regulator of human energy homeostasis*. Am J Clin Nutr, 2009. **89**(3): p. 980S-984S.
151. Fantuzzi, G. and R. Faggioni, *Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis*. J Leukoc Biol, 2000. **68**(4): p. 437-46.
152. Rogers, R.C., M.J. Barnes, and G.E. Hermann, *Leptin "gates" thermogenic action of thyrotropin-releasing hormone in the hindbrain*. Brain Res, 2009. **1295**: p. 135-41.
153. Ben-Eliezer, M., M. Phillip, and G. Gat-Yablonski, *Leptin regulates chondrogenic differentiation in ATDC5 cell-line through JAK/STAT and MAPK pathways*. Endocrine, 2007. **32**(2): p. 235-44.
154. Ahima, R.S. and J.S. Flier, *Leptin*. Annu Rev Physiol, 2000. **62**: p. 413-37.
155. Sagawa, N., et al., *Role of leptin in pregnancy--a review*. Placenta, 2002. **23 Suppl A**: p. S80-6.
156. Martin-Romero, C., et al., *Human leptin enhances activation and proliferation of human circulating T lymphocytes*. Cell Immunol, 2000. **199**(1): p. 15-24.
157. Santos-Alvarez, J., R. Goberna, and V. Sanchez-Margalet, *Human leptin stimulates proliferation and activation of human circulating monocytes*. Cell Immunol, 1999. **194**(1): p. 6-11.
158. Holness, M.J., M.J. Munns, and M.C. Sugden, *Current concepts concerning the role of leptin in reproductive function*. Mol Cell Endocrinol, 1999. **157**(1-2): p. 11-20.
159. Lage, M., et al., *Serum leptin levels in women throughout pregnancy and the postpartum period and in women suffering spontaneous abortion*. Clin Endocrinol (Oxf), 1999. **50**(2): p. 211-6.
160. Cervero, A., et al., *The leptin system during human endometrial receptivity and preimplantation development*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(5): p. 2442-51.
161. Henson, M.C. and V.D. Castracane, *Leptin in pregnancy*. Biol Reprod, 2000. **63**(5): p. 1219-28.
162. Reitman, M.L., et al., *Leptin and its role in pregnancy and fetal development--an overview*. Biochem Soc Trans, 2001. **29**(Pt 2): p. 68-72.

163. Hassink, S.G., et al., *Placental leptin: an important new growth factor in intrauterine and neonatal development?* Pediatrics, 1997. **100**(1): p. E1.
164. Wyrwoll, C.S., P.J. Mark, and B.J. Waddell, *Directional secretion and transport of leptin and expression of leptin receptor isoforms in human placental BeWo cells.* Mol Cell Endocrinol, 2005. **241**(1-2): p. 73-9.
165. Bi, S., et al., *Identification of a placental enhancer for the human leptin gene.* J Biol Chem, 1997. **272**(48): p. 30583-8.
166. Castellucci, M., et al., *Leptin modulates extracellular matrix molecules and metalloproteinases: possible implications for trophoblast invasion.* Mol Hum Reprod, 2000. **6**(10): p. 951-8.
167. Conus, S., A. Bruno, and H.U. Simon, *Leptin is an eosinophil survival factor.* J Allergy Clin Immunol, 2005. **116**(6): p. 1228-34.
168. Gordeladze, J.O. and J.E. Reseland, *A unified model for the action of leptin on bone turnover.* J Cell Biochem, 2003. **88**(4): p. 706-12.
169. Najib, S. and V. Sanchez-Margalet, *Human leptin promotes survival of human circulating blood monocytes prone to apoptosis by activation of p42/44 MAPK pathway.* Cell Immunol, 2002. **220**(2): p. 143-9.
170. Perez-Perez, A., et al., *Leptin prevents apoptosis of trophoblastic cells by activation of MAPK pathway.* Arch Biochem Biophys, 2008. **477**(2): p. 390-5.
171. Mise, H., et al., *Augmented placental production of leptin in preeclampsia: possible involvement of placental hypoxia.* J Clin Endocrinol Metab, 1998. **83**(9): p. 3225-9.
172. Lepercq, J., et al., *Overexpression of placental leptin in diabetic pregnancy: a critical role for insulin.* Diabetes, 1998. **47**(5): p. 847-50.
173. Sagawa, N., et al., *Leptin production by hydatidiform mole.* Lancet, 1997. **350**(9090): p. 1518-9.
174. Toth, B., et al., *Insulin and leptin receptors as possible new candidates for endocrine control in normal and disturbed human pregnancy.* Mol Hum Reprod, 2009. **15**(4): p. 231-9.
175. Li, R.H., et al., *Expression of leptin and leptin receptors in gestational trophoblastic diseases.* Gynecol Oncol, 2004. **95**(2): p. 299-306.
176. Harris, L.K., *Review: Trophoblast-vascular cell interactions in early pregnancy: how to remodel a vessel.* Placenta, 2010. **31 Suppl**: p. S93-8.
177. Breckwoldt, M. and G. Martius, *Gynäkologie und Geburtshilfe : 117 Tabellen.* 5., aktualisierte und überarb. Aufl. ed. 2008, Stuttgart [u.a.]: Thieme. XVII, 543 S.
178. Rath W., G.U., Schmidt S. , *Geburtshilfe und Perinatalmedizin: Pränataldiagnostik - Erkrankungen - Entbindung.* Georg Thieme Verlag, 2010(2. Auflage ).
179. Pijnenborg, R., et al., *Uteroplacental arterial changes related to interstitial trophoblast migration in early human pregnancy.* Placenta, 1983. **4**(4): p. 397-413.
180. Pospechova, K., et al., *Expression and activity of vitamin D receptor in the human placenta and in choriocarcinoma BeWo and JEG-3 cell lines.* Mol Cell Endocrinol, 2009. **299**(2): p. 178-87.
181. Syme, M.R., J.W. Paxton, and J.A. Keelan, *Drug transfer and metabolism by the human placenta.* Clin Pharmacokinet, 2004. **43**(8): p. 487-514.
182. Al-Nasiry, S., et al., *Differential effects of inducers of syncytialization and apoptosis on BeWo and JEG-3 choriocarcinoma cells.* Hum Reprod, 2006. **21**(1): p. 193-201.
183. Jeschke, U., et al., *Expression of the Thomsen-Friedenreich antigen and of its putative carrier protein mucin 1 in the human placenta and in trophoblast cells in vitro.* Histochem Cell Biol, 2002. **117**(3): p. 219-26.
184. Wice, B., et al., *Modulators of cyclic AMP metabolism induce syncytiotrophoblast formation in vitro.* Exp Cell Res, 1990. **186**(2): p. 306-16.
185. Grummer, R., et al., *Adhesion and invasion of three human choriocarcinoma cell lines into human endometrium in a three-dimensional organ culture system.* Placenta, 1994. **15**(4): p. 411-29.



186. Chiu, P.M., et al., *Effect of all-trans retinoic acid on tissue dynamics of choriocarcinoma cell lines: an organotypic model*. J Clin Pathol, 2006. **59**(8): p. 845-50.
187. Hustin, J., E. Jauniaux, and J.P. Schaaps, *Histological study of the materno-embryonic interface in spontaneous abortion*. Placenta, 1990. **11**(6): p. 477-86.
188. Michel, M.Z., et al., *A morphological and immunological study of human placental bed biopsies in miscarriage*. Br J Obstet Gynaecol, 1990. **97**(11): p. 984-8.
189. Jauniaux, E. and G.J. Burton, *Pathophysiology of histological changes in early pregnancy loss*. Placenta, 2005. **26**(2-3): p. 114-23.
190. Burton, G.J. and E. Jauniaux, *Placental oxidative stress: from miscarriage to preeclampsia*. J Soc Gynecol Investig, 2004. **11**(6): p. 342-52.
191. Minas, V., et al., *Abortion is associated with increased expression of FasL in decidual leukocytes and apoptosis of extravillous trophoblasts: a role for CRH and urocortin*. Mol Hum Reprod, 2007. **13**(9): p. 663-73.
192. Eberstadt, M., et al., *NMR structure and mutagenesis of the FADD (Mort1) death-effector domain*. Nature, 1998. **392**(6679): p. 941-5.
193. Wajant, H., *The Fas signaling pathway: more than a paradigm*. Science, 2002. **296**(5573): p. 1635-6.
194. Madhappan, B., et al., *High levels of intrauterine corticotropin-releasing hormone, urocortin, tryptase, and interleukin-8 in spontaneous abortions*. Endocrinology, 2003. **144**(6): p. 2285-90.
195. Guibourdenche, J., et al., *High retinoid X receptor expression in JEG-3 choriocarcinoma cells: involvement in cell function modulation by retinoids*. J Cell Physiol, 1998. **176**(3): p. 595-601.
196. Rebourcet, R., et al., *Endothelin-2 down-regulation occurs in parallel with the anti-proliferative effect of dimethylsulfoxide in BeWO human choriocarcinoma cell line*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2004. **50 Online Pub**: p. OL701-12.
197. Pestka, A., et al., *Retinoid-X-receptor {alpha} and retinoids are key regulators in apoptosis of trophoblasts of patients with recurrent miscarriages*. J Mol Endocrinol, 2011.
198. Noll, S., S. Schaub-Kuhnen, and H. Höfler, *Praxis der Immunhistochemie*. 1. Aufl. ed. 2000, München [u.a.]: Urban & Fischer. XI, 147 S.
199. Toma, S., et al., *Induction of apoptosis in MCF-7 breast carcinoma cell line by RAR and RXR selective retinoids*. Anticancer Res, 1998. **18**(2A): p. 935-42.
200. Levenson, A.S. and V.C. Jordan, *MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line*. Cancer Res, 1997. **57**(15): p. 3071-8.
201. Garofalo, C., et al., *Increased expression of leptin and the leptin receptor as a marker of breast cancer progression: possible role of obesity-related stimuli*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(5): p. 1447-53.
202. Wong, S.Y., et al., *Apoptosis in gestational trophoblastic disease is correlated with clinical outcome and Bcl-2 expression but not Bax expression*. Mod Pathol, 1999. **12**(11): p. 1025-33.
203. Lattuada, D., et al., *Accumulation of retinoid X receptor-alpha in uterine leiomyomas is associated with a delayed ligand-dependent proteasome-mediated degradation and an alteration of its transcriptional activity*. Mol Endocrinol, 2007. **21**(3): p. 602-12.
204. Taschner, S., et al., *Down-regulation of RXRalpha expression is essential for neutrophil development from granulocyte/monocyte progenitors*. Blood, 2007. **109**(3): p. 971-9.
205. Nomura, Y., et al., *9-cis-retinoic acid decreases the level of its cognate receptor, retinoid X receptor, through acceleration of the turnover*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **260**(3): p. 729-33.
206. Boudjelal, M., J.J. Voorhees, and G.J. Fisher, *Retinoid signaling is attenuated by proteasome-mediated degradation of retinoid receptors in human keratinocyte HaCaT cells*. Exp Cell Res, 2002. **274**(1): p. 130-7.
207. Morris-Kay, G., *Retinoids in Normal Development and Teratogenesis*. Oxford Science Publications, 1992. **20**(4).

208. Nawaz, Z., et al., *Proteasome-dependent degradation of the human estrogen receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(5): p. 1858-62.
209. Dace, A., et al., *Hormone binding induces rapid proteasome-mediated degradation of thyroid hormone receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(16): p. 8985-90.
210. Osburn, D.L., et al., *Ligand-dependent degradation of retinoid X receptors does not require transcriptional activity or coactivator interactions*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(15): p. 4909-18.
211. Hollung, K., et al., *Tissue-specific regulation of leptin expression and secretion by all-trans retinoic acid*. J Cell Biochem, 2004. **92**(2): p. 307-15.
212. Krskova-Tybitanclova, K., et al., *Short term 13-cis-retinoic acid treatment at therapeutic doses elevates expression of leptin, GLUT4, PPARgamma and aP2 in rat adipose tissue*. J Physiol Pharmacol, 2008. **59**(4): p. 731-43.
213. Villarroya, F., M. Giralt, and R. Iglesias, *Retinoids and adipose tissues: metabolism, cell differentiation and gene expression*. Int J Obes Relat Metab Disord, 1999. **23**(1): p. 1-6.
214. Levin, A.A., et al., *9-cis retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXR alpha*. Nature, 1992. **355**(6358): p. 359-61.
215. Bernstein, P.S., W.C. Law, and R.R. Rando, *Isomerization of all-trans-retinoids to 11-cis-retinoids in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(7): p. 1849-53.
216. Menendez, C., et al., *Retinoic acid and vitamin D(3) powerfully inhibit in vitro leptin secretion by human adipose tissue*. J Endocrinol, 2001. **170**(2): p. 425-31.
217. Shulman, A.I., et al., *Structural determinants of allosteric ligand activation in RXR heterodimers*. Cell, 2004. **116**(3): p. 417-29.
218. Gordeladze, J.O., et al., *Leptin stimulates human osteoblastic cell proliferation, de novo collagen synthesis, and mineralization: Impact on differentiation markers, apoptosis, and osteoclastic signaling*. J Cell Biochem, 2002. **85**(4): p. 825-36.
219. Laird, S.M., et al., *Leptin and leptin-binding activity in women with recurrent miscarriage: correlation with pregnancy outcome*. Hum Reprod, 2001. **16**(9): p. 2008-13.
220. Jeschke, U., et al., *Binding of galectin-1 (gal-1) to the Thomsen-Friedenreich (TF) antigen on trophoblast cells and inhibition of proliferation of trophoblast tumor cells in vitro by gal-1 or an anti-TF antibody*. Histochem Cell Biol, 2006. **126**(4): p. 437-44.
221. de la Brousse, F.C., B. Shan, and J.L. Chen, *Identification of the promoter of the mouse obese gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(9): p. 4096-101.
222. He, Y., et al., *The mouse obese gene. Genomic organization, promoter activity, and activation by CCAAT/enhancer-binding protein alpha*. J Biol Chem, 1995. **270**(48): p. 28887-91.
223. Jacquemin, P., et al., *The enhancers of the human placental lactogen B, A, and L genes: progressive activation during in vitro trophoblast differentiation and importance of the DF-3 element in determining their respective activities*. DNA Cell Biol, 1996. **15**(10): p. 845-54.
224. Pineiro, V., et al., *Dihydrotestosterone, stanozolol, androstenedione and dehydroepiandrosterone sulphate inhibit leptin secretion in female but not in male samples of omental adipose tissue in vitro: lack of effect of testosterone*. J Endocrinol, 1999. **160**(3): p. 425-32.
225. Yura, S., et al., *Augmentation of leptin synthesis and secretion through activation of protein kinases A and C in cultured human trophoblastic cells*. J Clin Endocrinol Metab, 1998. **83**(10): p. 3609-14.
226. Makowske, M., et al., *Immunochemical evidence that three protein kinase C isozymes increase in abundance during HL-60 differentiation induced by dimethyl sulfoxide and retinoic acid*. J Biol Chem, 1988. **263**(7): p. 3402-10.

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Funktioneller Aufbau eines nukleären Rezeptors .....	5
Abbildung 2: Transkriptionsaktivierung des heterodimeren Komplexes PPAR/RXR im Zellkern [40] .....	6
Abbildung 3: Darstellung der Umwandlung der Retinsäure-Stereoisomere und der Bindung der RXR/RXR und RXR/RAR Heterodimere an die Response Elemente RXRE und RARE [75] Abbildung der chemischen Strukturen der Retinsäure-Isoformen. ....	10
Abbildung 4: Aktivierung des Leptin Rezeptors [138] .....	13
Abbildung 5: Stadien der Implantation [174] .....	17
Abbildung 6: Die Avidin-Biotin-Methode [195] .....	33
Abbildung 7: Positivkontrollen von RXR $\alpha$ an MCF-7-Zellen .....	49
Abbildung 8: Negativkontrollen von RXR $\alpha$ an MCF-7 und JEG-3-Zellen .....	50
Abbildung 9: Immunzytochemische Analyse der RXR $\alpha$ Expression nach Inkubation von BeWo Zellen mit 10 nmol/ml 9- <i>cis</i> RA, ATRA und 15d-J <sub>2</sub> für 24h. ....	51
Abbildung 10: Digitale Aufnahmen der RXR $\alpha$ Expression in BeWo Zellen nach Inkubation mit 10 nmol/ml 9- <i>cis</i> RA, ATRA und 15d-J <sub>2</sub> für 24h .....	51
Abbildung 11: Immunzytochemische Analyse der RXR $\alpha$ Expression nach Inkubation von BeWo Zellen mit 10 nmol/ml 9- <i>cis</i> RA, ATRA und 15d-J <sub>2</sub> für 48h. ....	52
Abbildung 12: Digitale Aufnahmen der RXR $\alpha$ Expression in BeWo Zellen nach Inkubation mit 10 nmol/ml 9- <i>cis</i> RA, ATRA und 15d-J <sub>2</sub> für 48h. ....	52
Abbildung 13: Immunzytochemische Analyse der RXR $\alpha$ Expression nach Inkubation von BeWo Zellen mit 1 nmol/ml 9- <i>cis</i> RA, ATRA und 15d-J <sub>2</sub> für 24h. ....	54
Abbildung 14: Digitale Aufnahmen der RXR $\alpha$ Expression in BeWo Zellen nach Inkubation mit 1 nmol/ml 9- <i>cis</i> RA, ATRA und 15d-J <sub>2</sub> für 24h .....	54
Abbildung 15: Immunzytochemische Analyse der RXR $\alpha$ Expression nach Inkubation von BeWo Zellen mit 1 nmol/ml 9- <i>cis</i> RA, ATRA und 15d-J <sub>2</sub> für 48h. ....	55
Abbildung 16: Digitale Aufnahmen der RXR $\alpha$ Expression in BeWo Zellen nach Inkubation mit 1 nmol/ml 9- <i>cis</i> RA, ATRA und 15d-J <sub>2</sub> für 48h. ....	55
Abbildung 17: Immunzytochemische Analyse der RXR $\alpha$ Expression nach Inkubation von JEG-3 Zellen mit 10 nmol/ml 9- <i>cis</i> RA, ATRA und 15d-J <sub>2</sub> für 24h. ....	57

Abbildung 18: Digitale Aufnahmen der RXR $\alpha$ Expression in JEG-3 Zellen nach Inkubation mit 10 nmol/ml 9- <i>cis</i> RA, ATRA und 15d-J <sub>2</sub> für 24h.....	57
Abbildung 19: Immunzytochemische Analyse der RXR $\alpha$ Expression nach Inkubation von JEG-3 Zellen mit 10 nmol/ml 9- <i>cis</i> RA, ATRA und 15d-J <sub>2</sub> für 48h.....	58
Abbildung 20: Digitale Aufnahmen der RXR $\alpha$ Expression in JEG-3 Zellen nach Inkubation mit 10 nmol/ml 9- <i>cis</i> RA, ATRA und 15d-J <sub>2</sub> für 48h.....	58
Abbildung 21: Immunzytochemische Analyse der RXR $\alpha$ Expression nach Inkubation von JEG-3 Zellen mit 1 nmol/ml 9- <i>cis</i> RA, ATRA und 15d-J <sub>2</sub> für 24h.....	59
Abbildung 22: Digitale Aufnahmen der RXR $\alpha$ Expression in JEG-3 Zellen nach Inkubation mit 1 nmol/ml 9- <i>cis</i> RA, ATRA und 15d-J <sub>2</sub> für 24h.....	59
Abbildung 23: Immunzytochemische Auswertung der RXR $\alpha$ Expression nach Inkubation von JEG-3 Zellen mit 1 nmol/ml 9- <i>cis</i> RA, ATRA und 15d-J <sub>2</sub> für 48h.....	60
Abbildung 24: Digitale Aufnahmen der RXR $\alpha$ Expression in JEG-3 Zellen nach Inkubation mit 1 nmol/ml 9- <i>cis</i> RA, ATRA und 15d-J <sub>2</sub> für 48h.....	60
Abbildung 25: Immunzytochemische Analyse der RXR $\alpha$ Expression nach Inkubation von HVT-Zellen mit 10 nmol/ml 9- <i>cis</i> RA, ATRA und 15d-J <sub>2</sub> für 72h.....	62
Abbildung 26: Digitale Aufnahmen der RXR $\alpha$ Expression in HVT nach Inkubation mit 10 nmol/ml 9- <i>cis</i> RA, ATRA und 15d-J <sub>2</sub> für 72h.....	62
Abbildung 27: Western Blot der RXR $\alpha$ Expression in BeWo und JEG-3 Zelllysaten ....	64
Abbildung 28: Quantitative Real-time PCR (TaqMan®-PCR) Auswertung der RXR $\alpha$ mRNA Expression in BeWo Zellen nach Inkubation mit 10 nmol/ml 9- <i>cis</i> RA für 4h.....	65
Abbildung 29: Quantitative Real-time PCR (TaqMan®-PCR) Auswertung der RXR $\alpha$ mRNA Expression in BeWo Zellen nach Inkubation mit 10 nmol/ml 15d-J <sub>2</sub> für 4h. ....	66
Abbildung 30: Quantitative Real-time PCR (TaqMan®-PCR) Auswertung der RXR $\alpha$ mRNA Expression in JEG-3 Zellen nach Stimulation mit 10 nmol/ml 9- <i>cis</i> RA für 8h. ..	66
Abbildung 31: Quantitative Real-time PCR (TaqMan®-PCR) Auswertung der RXR $\alpha$ mRNA Expression in JEG-3 Zellen nach Stimulation mit 10 nmol/ml 15d-J <sub>2</sub> für 8h.....	67
Abbildung 32: Positiv- und Negativkontrollen von ObR.....	68
Abbildung 33: Digitale Aufnahme der immunzytochemischen Analyse der ObR Expression in BeWo Zellen nach Inkubation mit 10 nmol/ml 9- <i>cis</i> RA .....	69
Abbildung 34: Digitale Aufnahme der immunzytochemischen Analyse der ObR Expression in JEG-3 Zellen nach Inkubation mit 10 nmol/ml 9- <i>cis</i> RA.....	70

Abbildung 35: Dot Blot Auswertung der ObR Expression nach Inkubation von JEG-3 Zellen mit 10 nmol/ml 9- <i>cis</i> RA für 24h. ....	71
Abbildung 36: Darstellung Dot Blot von JEG-3 Zellen. Inkubation von JEG-3 Zellen mit 10 nmol/ml 9- <i>cis</i> RA und 15d-J <sub>2</sub> für 24h. ....	71
Abbildung 37: Dot Blot Auswertung der ObR Expression nach Inkubation von BeWo Zellen mit 10 nmol/ml 9- <i>cis</i> RA für 24h. ....	72
Abbildung 38: Darstellung (Screenshot) der Auswertung der Helligkeitsverteilung der Punkte im Dot Blot mittels des Gimp® Graphikbearbeitungsprogramms. ....	72
Abbildung 39: Quantitative Real-time PCR (TaqMan®-PCR) Auswertung der ObR mRNA Expression in JEG-3 Zellen nach Stimulation mit 10 nmol/ml 9- <i>cis</i> RA. ....	73
Abbildung 40: Quantitative Real-time PCR (TaqMan®-PCR) Auswertung der ObR mRNA Expression in BeWo Zellen nach Stimulation mit 10 nmol/ml 9- <i>cis</i> RA für 4h....	74
Abbildung 41: Doppelimmunfluoreszenz-Färbung mit den Primärantikörpern M30-CytoDEATH™ (M30) und dem polyklonalen Anti-RXRα .....	75
Abbildung 42: Doppelimmunfluoreszenz-Färbung mit den Primärantikörpern M30-CytoDEATH™ (M30) und des polyklonalen Anti-ObR.....	76

## 10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Nukleäre Rezeptoren Superfamilien I-VI .....	4
Tabelle 2: RXR $\alpha$ -, ObR- und Leptin Expression in VT und EVT von Aborten im Vergleich zur Expression in VT und EVT von gesunden Schwangerschaften.....	15
Tabelle 3: RXR $\alpha$ -, ObR- und Leptin Expression in VT und EVT in der Blasenmole im Vergleich zur Expression in VT und EVT von gesunden Schwangerschaften.....	16
Tabelle 4: Komponenten des 2xRT-Mastermixes .....	43
Tabelle 5: Komponenten des Mastermixes für die TaqMan®-PCR.....	44
Tabelle 6: Verwendete Primer für die TaqMan®-PCR .....	44

## 11 Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

Die vorliegende Arbeit ist Bestandteil der folgenden Publikationen, Vorträge und Posterpräsentationen.

### ORIGINALARBEITEN und REVIEWS

---

- 08/2010 P. Arck, B. Toth, **A. Pestka**, U. Jeschke. Nuclear receptors of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) family in gestational diabetes: from animal models to clinical trials.  
*Biology of Reproduction* 2010 Aug 1;83(2):168-76. Epub 2010 Apr 28. Review.
- 08/2011 **A. Pestka**, B. Toth, C. Kuhn, S. Hofmann, I. Wiest, G. Wypior, K. Friese, U. Jeschke. Retinoid-X-receptor and retinoids are key regulators in apoptosis of trophoblasts of patients with recurrent miscarriages.  
*Journal of Molecular Endocrinology* 2011 Aug 30;47(2):145-56. Print 2011.
- 09/2011 R. Pavlik, G. Wypior, S. Hecht, P. Papadopoulos, M. Kupka, C. Thaler, I. Wiest, **A. Pestka**, K. Friese, U. Jeschke. Induction of G protein-coupled estrogen receptor (GPER) and nuclear steroid hormone receptors by gonadotropins in human granulosa cells.  
*Journal of Histochemistry and Cell Biology* 2011 Sep;136(3):289-99. doi: 10.1007/s00418-011-0846-7. Epub 2011 Aug 2.
- 10/2012 **A. Pestka**, JS. Fitzgerald, B. Toth, U. Markert, Jeschke U. Nuclear Hormone Receptors and Female Reproduction.  
*Current Molecular Medicine*, 2012 Oct 3. Review

### VORTRAG

---

- 11/2010 **A. Pestka**, B. Toth, U. Jeschke, C. Kuhn, S. Hofmann, I. Wiest, K. Friese. Modulation of RXR alpha and leptin receptor expression in choriocarcinoma cells and their co-expression with M30-CytoDeath in miscarried placentas  
*8th European Congress on Reproductive Immunology der European Society for Reproductive Immunology (ESRI), München*

### POSTERPRÄSENTATIONEN

---

- 06/2009 **A. Pestka**, B. Toth, C. Scholz, C. Kuhn, U. Jeschke, K. Friese. Expression von nukleären Hormonrezeptoren in Trophoblasttumorzellen in vitro

*Jahrestagung 2009 und Fortbildungsveranstaltung der Österreichischen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (OEGGG) gemeinsam mit der Bayerischen Gesellschaft für Geburtshilfe und Frauenheilkunde (BGGF), Wien, Österreich*

- 09/2009 **A. Pestka**, B. Toth, C. Scholz, C. Kuhn, U. Jeschke, K. Friese. Impact on the expression of the retinoid X receptor alpha in trophoblast tumor cells in vitro  
*7th European Congress on Reproductive Immunology der European Society for Reproductive Immunology (ESRI), 2009, Marathon, Griechenland*
- 02/2010 **A. Pestka**, B. Toth, C. Scholz, C. Kuhn, U. Jeschke, K. Friese. Die Bedeutung der Expression des RXR  $\alpha$  in trophoblastären Tumorzellen in vitro  
*43. Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung gleichzeitig 35. Veterinär-humanmedizinische Gemeinschaftstagung, München*
- 06/2010 **A. Pestka**, U. Jeschke, B. Toth, C. Kuhn, S. Hofmann, I. Wiest, K. Friese. RXR Agonisten modulieren die Leptin Rezeptor Expression in Chorionkarzinomzellen in vitro  
*84. Tagung der Bayerischen Gesellschaft für Geburtshilfe und Frauenheilkunde (BGGF), Erlangen*
- 06/2010 **A. Pestka**, U. Jeschke, B. Toth, C. Kuhn, S. Hofmann, I. Wiest, K. Friese. Simultane Expression von M30 CytoDEATH und des Retinoid-X-Rezeptors  $\alpha$  bzw. des Leptin Rezeptors  
*84. Tagung der Bayerischen Gesellschaft für Geburtshilfe und Frauenheilkunde (BGGF), Erlangen*
- 10/2010 **A. Pestka**, B. Toth, U. Jeschke, C. Kuhn, S. Hofmann, I. Wiest, K. Friese. Bedeutung des Retinoid-X-Rezeptors  $\alpha$ , des Leptin Rezeptors und der Retinoide für apoptotische Prozesse in Abort-Plazenten  
*59. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG), München*



**12 Curriculum Vitae**

## **13 Danksagung**

Herrn Professor Dr. Frieze möchte ich meinen besonderen Dank ausdrücken, dass ich die Gelegenheit hatte die Dissertation an seiner Klinik erstellen zu können.

Mein ausdrücklicher Dank gilt meinem Doktorvater Professor Dr. Jeschke, dem Initiator der Dissertation, der mich in sein Team aufgenommen hat und mich über die gesamte Dauer der Forschungsarbeit hervorragend betreut hat. Professor Jeschkes Fachwissen und seine unablässige Bereitwilligkeit auf meine Fragen einzugehen, habe ich stets als motivierend empfunden und ich freue mich auf die weitere Zusammenarbeit.

Meiner Betreuerin Frau Professor Dr. Toth möchte ich herzlich für die sehr gute Supervision und die zielgerichtete wissenschaftliche Unterstützung bei gemeinsamen Publikationen und Kongressbeiträgen danken.

Dem Laborteam Frau Hofmann, Frau Kuhn und Frau Wiest, wie auch meinen Mitdoktorandinnen Frau Tschakert und Frau Wypior möchte ich vor allem für die großartige kollegiale Zusammenarbeit und die fachliche Unterstützung Dank sagen.

Meinem Partner, meinen Eltern und meinem Bruder, die mich während der Dissertationsphase immerzu einzigartig und liebevoll unterstützt haben, danke ich von ganzem Herzen.

## **14 Ehrenwörtliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

**„Die Bedeutung des Retinoid-X-Rezeptors  $\alpha$ , des Leptin Rezeptors und der Retinoide für apoptotische Prozesse in Abortplazenten“**

ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- beziehungsweise Beratungsdiensten (Promotionsberater oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.